

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 659 941**

51 Int. Cl.:

G01N 15/00 (2006.01)

B01F 5/00 (2006.01)

C12N 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.02.2012 PCT/IB2012/000511**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.09.2013 WO13128224**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.02.2012 E 12716598 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.12.2017 EP 2820393**

54 Título: **Método de formación de un agregado de células**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.03.2018

73 Titular/es:
**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (50.0%)
3, rue Michel-Ange
75794 Paris Cedex 16, FR y
ECOLE SUPÉRIEURE DE PHYSIQUE ET DE
CHIMIE INDUSTRIELLES DE LA VILLE DE PARIS
(50.0%)**

72 Inventor/es:
**HOYOS, MAURICIO y
CASTRO CAMACHO, LUZ ANGELICA**

74 Agente/Representante:
LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 659 941 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método de formación de un agregado de células

- 5 La presente invención se refiere a métodos de formación de un agregado de objetos en un microcanal que comprende un líquido.

Antecedentes

- 10 Las técnicas de manipulación celular son importantes en muchas áreas de investigación que incluyen biología celular, genética molecular, producción biotecnológica, diagnóstico y terapia clínicos. Los métodos físicos de manipulación de células suspendidas a resolución microscópica de partículas individuales incluyen atrapamiento hidrodinámico, óptico, dielectroforético, magnético y ultrasónico de células.
- 15 De los métodos mencionados anteriormente, el atrapamiento ultrasónico se ha aprovechado menos extensamente. En comparación con otros métodos, la manipulación celular ultrasónica es una técnica sin contacto barata, que permite la manipulación simultánea y sincrónica de un gran número de células en un tiempo muy corto. Es simple tanto en su configuración como en su funcionamiento, y es no invasiva, químicamente inerte (no tóxica) y físicamente no destructiva. Teniendo en cuenta su alta eficiencia y fiabilidad, y el hecho de que puede usarse con la
- 20 mayoría de tipos de células, esta técnica ofrece grandes expectativas en las técnicas de manipulación celular para una variedad de aplicaciones.

- Las fuerzas que actúan sobre las partículas en un resonador acústico se han estudiado en diferentes condiciones y para diferentes propósitos. El origen de las fuerzas acústicas generadas por las ondas estacionarias ultrasónicas se ha aprovechado extensamente. Dependiendo de las condiciones experimentales, algunas de estas fuerzas pueden generarse y cuantificarse. La fuerza acústica más estudiada es la PRF (*primary radiation force*, fuerza de radiación primaria), que es la fuerza generada por una onda estacionaria ultrasónica que se produce entre las paredes de un resonador. En el caso de una cámara llena de fluido cerrada, se obtiene resonancia cuando su grosor es igual a: $w = N\lambda/2$, donde N es el número de nodos en la cámara y λ es la longitud de onda ultrasónica. La fuerza acústica F_{ac}
- 25 impulsa las partículas hacia los nodos o antinodos dependiendo de sus propiedades acústicas. $F_{ac} = V k \tilde{A} \langle E_{ac} \rangle \sin(2kx)$, donde V es el volumen de partícula, $k = 2\pi/\lambda$ es el número de onda, $\tilde{A} = [3(\rho_p - \rho_f) / (2\rho_p + \rho_f) - (c_p^2 \rho_p / c_f^2 \rho_f)]$ es el factor de contraste acústico, donde c_p y c_f son las velocidades del sonido de las partículas y del fluido respectivamente, y $\langle E_{ac} \rangle$ es la densidad de energía acústica promedio. Se conoce ampliamente que la PRF aparece como un segundo orden de la ecuación de Navier-Stokes. El orden de
- 30 magnitud de la fuerza acústica es realmente bajo ($\sim 10^{-9}$ N), pero suficientemente alto para influir sobre partículas de tamaño micrométrico, células, lípidos o incluso bacterias.

- También se han descrito varias de otras fuerzas acústicas primarias y secundarias, concretamente: las fuerzas de Bjerknes primaria y secundaria, la fuerza interparticular secundaria y la fuerza generada por la componente transversal de la PRF; se considera que la última es la fuerza reinante que influye sobre el proceso de agregación. Varios informes han demostrado que todas las fuerzas mencionadas anteriormente son al menos dos órdenes de magnitud más pequeñas que la componente axial de la fuerza primaria. Sin embargo, cuando las partículas alcanzan el plano nodal, la fuerza neta axial es cero, revelando por tanto las fuerzas transversales que conducen al
- 40 inicio de la agregación.

- 45 El proceso de agregación empieza cuando partículas aisladas en levitación convergen en un punto específico, en el que la energía acústica es máxima.

- La migración transversal de partículas en el plano nodal se deba a un acoplamiento complejo entre fuerzas generadas por la distribución del campo de energía no homogénea en la cámara y la PRF transversal originada por las imperfecciones del resonador (por ejemplo, el paralelismo de las vibraciones de las paredes de resonador y las paredes laterales). Por tanto, la fuerza transversal de la partícula es difícil de predecir; sin embargo, midiendo la velocidad transversal de la partícula puede estimarse la fuerza transversal media F_{Tr} , considerando que está equilibrada por la fuerza de Stokes F_s , de modo que: $F_{Tr} - F_s = 0$, donde $F_s = 3 \pi \eta d v_{Tr}$, siendo d el diámetro de
- 50 partícula, η la viscosidad dinámica y v_{Tr} la velocidad transversal en el plano de levitación. La complejidad de las interacciones de aquellas fuerzas puede hacer que el proceso de agregación sea difícil de controlar. Sin embargo, se ha notificado que las configuraciones de agregados bidimensionales o tridimensionales pueden controlarse mediante la concentración inicial de células.

- 60 Se ha notificado anteriormente el uso de una trampa de ondas estacionarias ultrasónicas (USWT, *ultrasound standing wave trap*) que puede mantener > 10.000 células en el plano focal de un microscopio. La USWT es un resonador ultrasónico, en el que la longitud del trayecto acústico en la suspensión celular es una única media longitud de onda. El resonador tiene un plano nodal de presión a la mitad de la suspensión celular y paralelo al transductor. La trampa celular aprovecha el hecho de que las células experimentan una fuerza de radiación acústica
- 65 directa axial cuando están en un campo de ondas estacionarias ultrasónicas. Esta fuerza las impulsa hacia un plano

nodal. Entonces se mueven, dentro de ese plano, acumulándose en el centro del campo, es decir en el plano nodal. La USWT se ha usado para formar de manera síncrona y rápida (en el plazo de 10 s de segundos) y hacer levitar agregados celulares bidimensionales y tridimensionales en suspensión alejándolos de la influencia de sustratos sólidos.

5 A concentraciones celulares bajas ($\leq 5 \times 10^5$ células/ml) pueden generarse agregados bidimensionales, mientras que a concentraciones de $\geq 10^6$ células/ml pueden generarse agregados tridimensionales. Esto presenta un margen de concentración de partículas/células relativamente estrecho en el que pueden formarse agregados bidimensionales. Aunque, indudablemente, los agregados tridimensionales son más miméticos con el tejido, todavía hay un gran
10 interés en la forma bidimensional del agregado ya que esta facilita la resolución de la microscopía óptica de los procesos de interacción que se producen entre células.

Además, algunas de las técnicas conocidas pueden no permitir un mecanismo de agregación con control satisfactorio. Por ejemplo, una manera de controlar la velocidad de agregación es ajustando la frecuencia de resonancia. Sin embargo, en este caso, las velocidades de las partículas cambian rápidamente en resonancia, dando como resultado una mala reproducibilidad. Por tanto existe una necesidad de obtener un método que permita un mecanismo de agregación más controlado.

20 Existe otra necesidad de obtener un método que permita la generación selectiva de agregados bidimensionales o tridimensionales.

La presente invención pretende cubrir una o más de las necesidades mencionadas anteriormente.

Sumario

25 Según un primer aspecto, la presente invención proporciona un método de formación de un agregado de objetos en un microcanal según la reivindicación 1.

30 Por "agregado de objetos" quiere decirse una capa de objetos que cumple con todas de las siguientes características:

- al menos dos objetos comprendidos en dicha capa, en particular al menos el 10%, mejor el 25%, preferiblemente el 50% de los objetos comprendidos en dicha capa, están en contacto, y

35 - dicha capa presenta, al menos en una parte de su longitud, una sucesión de objetos al desplazarse a lo largo de al menos una de sus dimensiones transversales.

40 Los agregados obtenidos pueden comprender, en particular consistir en, filas yuxtapuestas de objetos. En este caso, los agregados se denominan agregados bidimensionales. Un agregado bidimensional puede extenderse en un plano.

En otra realización, los agregados obtenidos comprenden una pila de agregados bidimensionales. Una realización de este tipo es un ejemplo de un agregado tridimensional.

45 Un agregado es diferente de una línea de objetos que solo se extienden a lo largo de un eje. En otras palabras, una línea de objetos comprende solo un objeto en anchura, solo un objeto en grosor y una sucesión de objetos a lo largo de su longitud. Una pila de un agregado bidimensional y de una línea de objetos es otro ejemplo de un agregado tridimensional.

50 Por "campo acústico pulsado modulado en amplitud" quiere decirse una repetición de una pluralidad de grupos de pulsos de ondas acústicas, teniendo dichos pulsos, entre un grupo dado, sustancialmente la misma amplitud y frecuencia, estando separado cada uno de dichos grupos por un periodo que tiene una duración distinta de cero, en el que no se aplica ninguna onda acústica o en el que se aplica una onda acústica, teniendo dicha onda acústica al menos un extremo del valor absoluto de su amplitud que es diferente de la amplitud más alta de los pulsos de ondas
55 acústicas que pertenecen al grupo justo anterior a dicho periodo.

A menos que se especifique lo contrario, por "amplitud" quiere decirse la función matemática de evolución con respecto al tiempo del valor de una variable, por ejemplo de una onda acústica.

60 Según la invención, un pulso es un patrón de repetición de una onda acústica que presenta un máximo (es decir la amplitud más alta). En un grupo de pulsos de ondas acústicas, los pulsos se repiten sustancialmente de manera idéntica a sustancialmente la misma frecuencia de repetición. Por tanto, un grupo de pulsos puede consistir en una repetición periódica de pulsos. Un pulso puede ser una parte de una curva sinusoidal, en forma de triángulo o en forma de cuadrado.

65 La(s) onda(s) acústica(s) aplicada(s) durante el/los periodo(s) pueden comprender pulsos de ondas acústicas.

5 En el caso particular, en el que el campo acústico pulsado modulado aplicado en la etapa b) comprende una sucesión de conjuntos de pulsos de ondas acústicas, teniendo los pulsos presentes en cada uno de dicho conjunto la misma amplitud y frecuencia, el primer grupo de pulsos de ondas acústicas corresponde al primer conjunto de pulsos de ondas acústicas aplicados a los objetos durante la etapa b). Por tanto, en este ejemplo particular, el primer periodo que separa dos grupos corresponde al segundo conjunto de pulsos de ondas acústicas aplicados.

La presente invención puede permitir ventajosamente la obtención de un mecanismo de agregación más controlado.

10 La presente invención puede permitir ventajosamente la obtención de un agregado resultante, cuya arquitectura puede modificarse independientemente de la concentración de objetos inicial.

La presente invención puede permitir ventajosamente la reducción del calentamiento del generador de campo acústico en comparación con el uso de ultrasonido continuo.

15 La presente invención puede permitir ventajosamente la reducción del calentamiento de medios de los líquidos/objetos, manteniendo así constante las propiedades termodinámicas y fisicoquímicas de la suspensión.

20 La presente invención puede permitir ventajosamente la obtención de una fuerza acústica aumentada a través del empleo de un número mínimo de pulsos que da como resultado una agregación de objetos rápida pero controlada sin afectar adversamente a dichos objetos.

La presente invención puede permitir ventajosamente la generación selectiva de agregados bidimensionales o tridimensionales.

25 El agregado de objetos formado puede tener un tamaño de 1 nm o más, por ejemplo 1 μm o más, por ejemplo 1 mm o más.

Por "tamaño del agregado de objetos" quiere decirse su dimensión máxima.

30 El agregado formado puede no estabilizarse durante la etapa b).

Por "microcanales" quiere decirse un canal que tiene, por la totalidad de su longitud, un grosor que es menor de o igual a 1 mm.

35 Campo acústico pulsado modulado

Grupos de pulsos de ondas acústicas

40 En una realización de la invención, cada uno de los grupos de pulsos de ondas acústicas comprende 10 o más, preferiblemente 25 o más, preferiblemente 50 o más, preferiblemente 100 o más, pulsos de ondas acústicas.

45 En una realización de la invención, al menos uno, preferiblemente al menos el 25%, preferiblemente al menos el 50%, preferiblemente al menos el 75%, preferiblemente la totalidad, de los grupos de pulsos de ondas acústicas dura una duración t_1 que es mayor de o igual a 0,01 ms, preferiblemente a 0,025 ms.

La etapa b) puede comprender someter los objetos a al menos 100, por ejemplo 500, por ejemplo 1000, por ejemplo 5000, por ejemplo 10000, por ejemplo 25000, por ejemplo 50000, grupos de pulsos de ondas acústicas.

50 La amplitud de pulsos más alta en todos o parte de los grupos es preferiblemente mayor que el promedio temporal del valor absoluto de la amplitud de la(s) onda(s) acústica(s) aplicada(s) durante el/los periodo(s).

55 El promedio temporal del valor absoluto de la amplitud de la(s) onda(s) acústica(s) aplicada(s) durante el/los periodo(s) puede ser menor del o igual al 50%, preferiblemente menor del o igual al 25%, más preferiblemente menor del o igual al 10%, de la amplitud de pulsos más alta en el grupo justo anterior al/a los periodo(s) considerado(s).

La amplitud de pulsos más alta en todos o parte de los grupos puede ser mayor que la amplitud más alta de la(s) onda(s) acústica(s) aplicada(s) durante el/los periodo(s).

60 Tal como se destalla más adelante, es preferible que los grupos de pulsos de ondas acústicas estén separados durante la etapa b) por un(os) periodo(s), en el/los que no se aplica ninguna onda acústica.

65 Los pulsos de ondas acústicas que pertenecen a dos grupos sucesivos separados por al menos un periodo tienen de manera preferible sustancialmente la misma amplitud y frecuencia. En otras palabras, los pulsos de ondas

acústicas que pertenecen a dos grupos diferentes aplicados en la etapa b) tienen de manera preferible sustancialmente la misma amplitud y frecuencia.

5 En una realización, los grupos de pulsos de ondas acústicas están espaciados periódicamente entre sí por un periodo que tiene una duración distinta de cero.

Periodo(s) que separa(n) los grupos de pulsos de ondas acústicas

10 En una realización preferida, los grupos de pulsos de ondas acústicas están separados entre sí por un periodo que tiene una duración distinta de cero, en el que no se aplica ninguna onda acústica.

15 En una variante, también es posible que los grupos de pulsos de ondas acústicas están separados entre sí por un periodo que tiene una duración distinta de cero, en el que se aplica una onda acústica, que tiene por ejemplo la amplitud más alta, que es menor que la amplitud más alta de los pulsos de ondas acústicas presentes en el grupo justo anterior a dicho periodo.

20 En una realización, al menos un periodo, por ejemplo al menos el 25% de los periodos, por ejemplo al menos el 50% de los periodos, por ejemplo al menos el 75% de los periodos, por ejemplo la totalidad de los periodos, que separa dos grupos sucesivos de pulsos de ondas acústicas tiene una duración t_2 que es mayor de o igual a 0,05 ms, preferiblemente 0,1 ms, más preferiblemente a 0,2 ms.

25 En una realización, al menos un periodo, por ejemplo al menos el 25% de los periodos, por ejemplo al menos el 50% de los periodos, por ejemplo al menos el 75% de los periodos, por ejemplo la totalidad de los periodos, que separa dos grupos sucesivos de pulsos de ondas acústicas tiene una duración t_2 que es menor de o igual a 0,5 s, preferiblemente a 0,1 s, más preferiblemente a 0,01 s, más preferiblemente a 0,005 s.

Factor de modo de pulso

30 En una realización, al menos un par, por ejemplo al menos el 25% de los pares, por ejemplo al menos el 50% de los pares, por ejemplo al menos el 75% de los pares, por ejemplo la totalidad de los pares, de grupo consecutivo de pulsos de ondas acústicas de duración t_1 y periodo que separa dos grupos sucesivos de pulsos de ondas acústicas

$$P_{mf} = \frac{t_1}{t_1 + t_2}$$

de duración t_2 tiene un factor de modo de pulso que es mayor de o igual a 0,01, preferiblemente 0,025, más preferiblemente 0,1.

35 En una realización, al menos un par, por ejemplo al menos el 25% de los pares, por ejemplo al menos el 50% de los pares, por ejemplo al menos el 75% de los pares, por ejemplo la totalidad de los pares, de grupo consecutivo de pulsos de ondas acústicas de duración t_1 y periodo que separa dos grupos sucesivos de pulsos de ondas acústicas

$$P_{mf} = \frac{t_1}{t_1 + t_2}$$

de duración t_2 tiene un factor de modo de pulso que es menor de o igual a 0,95, preferiblemente 0,75, más preferiblemente 0,5.

40 En una realización, al menos dos pares de grupo consecutivo de pulsos de ondas acústicas de duración t_1 y periodo que separa dos grupos sucesivos de pulsos de ondas acústicas de duración t_2 tienen un factor de modo de pulso

$$P_{mf} = \frac{t_1}{t_1 + t_2} \text{ diferente.}$$

45 En una realización, todos los pares de grupo consecutivo de pulsos de ondas acústicas de duración t_1 y periodo que separa dos grupos sucesivos de pulsos de ondas acústicas de duración t_2 tienen sustancialmente el mismo factor de

$$\text{modo de pulso } P_{mf} = \frac{t_1}{t_1 + t_2}.$$

50 Naturalmente, la presente invención también abarca realizaciones en las que el campo acústico pulsado modulado aplicado en la etapa b) está modulado en amplitud y en frecuencia.

Velocidad promedio temporal de crecimiento del área superficial superior y/o inferior del agregado creado

55 En una realización, el área superficial superior y/o inferior del agregado creado tiene una velocidad promedio temporal de crecimiento durante la etapa b) que es menor de o igual a 0,1 mm²/s, preferiblemente 0,05 mm²/s, más preferiblemente 0,03 mm²/s, más preferiblemente 0,015 mm²/s.

Protocolo de medición

Las mediciones de las áreas superficiales de agregados de células y partículas se llevaron a cabo usando los software de procesamiento de imágenes Cell P (Soft Imaging System, SIS, GmbH) e Image J, respectivamente.

- 5 Se grabaron películas a una velocidad de 24 imágenes/s, y se determinó el área superficial del agregado usando la herramienta de software a mano alzada; se delineó el contorno del agregado en diferentes momentos durante el proceso de agregación y se calculó automáticamente el área superficial del agregado (en píxeles). Se cuantificó el área superficial del agregado normalizada dividiendo el área superficial del agregado en puntos de tiempo
- 10 específicos durante el proceso de agregación entre el área superficial del agregado cuando el crecimiento del agregado estaba completo, es decir cuando ninguna partícula ni célula individual se unía al agregado ya formado (algunas partículas permanecían todavía a una distancia con respecto al agregado central sin moverse o moviéndose a velocidades extremadamente bajas).
- 15 Finalmente, se estimó la velocidad promedio temporal de crecimiento del área superficial superior y/o inferior diferenciando el área superficial del agregado normalizada medida con respecto al tiempo para cada agregado creado.

Adaptación del campo acústico pulsado modulado

- 20 En una realización, durante la etapa b), se mide al menos una característica del agregado y se modifica al menos una característica del campo acústico pulsado modulado en función de esta medida.
- 25 La característica medida puede ser la velocidad temporal instantánea de crecimiento del área superficial superior y/o inferior del agregado creado.

Generador de campo acústico y ondas acústicas

- 30 En una realización preferida se crea una onda acústica estacionaria a lo largo de una dimensión transversal, preferiblemente a lo largo del grosor, del microcanal en la etapa b) durante la aplicación del campo acústico pulsado modulado.
- 35 La frecuencia de los pulsos de ondas acústicas presentes en todos o parte de los grupos de pulsos de ondas acústicas aplicados en la etapa b) puede ser de 10 MHz o menos, preferiblemente estar comprendida entre 0,5 y 10 MHz.
- El uso de un generador de campo acústico en tales intervalos de frecuencia puede facilitar ventajosamente el mantenimiento de la integridad de células u objetos vivos tales como vesículas, liposomas, bacterias o virus.
- 40 El campo acústico pulsado modulado usado en la etapa b) puede generarse ventajosamente a lo largo de un grosor del microcanal.
- El generador de campo acústico puede ser un elemento piezoeléctrico, por ejemplo cerámico.
- 45 Es posible, por ejemplo, usar un generador de campo acústico vendido con la referencia PZ26 por la empresa Ferroperm Piezoceramics, Kvistgard, Dinamarca.
- El generador de campo acústico puede controlarse digital o analógicamente.
- 50 El generador de campo acústico puede alimentarse mediante un generador de ondas, por ejemplo el modelo 5062 vendido por Tabor electronics, Israel.
- La onda emitida por el generador de ondas puede amplificarse mediante un amplificador, un amplificador de este tipo es, por ejemplo, el modelo 9250 vendido por Tabor electronics, Israel.
- 55 El generador de ondas puede, durante la etapa b), generar ondas que tienen una amplitud comprendida entre 0 y 40 Vp-p (voltios pico a pico), por ejemplo entre 0 y 20 Vp-p.
- 60 La densidad de energía acústica generada durante toda o parte de la etapa b) puede estar comprendida entre 1 y 1000 J/m³ (julios/m³), por ejemplo entre 1 y 300 J/m³, por ejemplo entre 5 y 50 J/m³, y puede ser, por ejemplo, de 10 J/m³.
- 65 La frecuencia de los pulsos de ondas acústicas presentes en todos o parte de los grupos de pulsos de ondas acústicas aplicados en la etapa b) puede ser una frecuencia resonante del microcanal a lo largo de una de sus dimensiones transversales.

Las dimensiones transversales del microcanal son el grosor y la anchura del microcanal.

Por "frecuencia principal que es una frecuencia resonante del microcanal a lo largo de una de sus dimensiones transversales" quiere decirse una frecuencia f_0 de modo que una dimensión transversal z del microcanal, medida en

- 5 una posición dada a lo largo del eje longitudinal del microcanal, cumple con $z = \frac{n\lambda}{2}$ donde n es un número entero,
- $$\lambda = \frac{c_f}{f_0}$$
- y con f_0 donde c_f es la velocidad del sonido en el líquido presente en el microcanal a la temperatura de dicho líquido, por ejemplo 20°C.

- 10 En otras palabras, la frecuencia f_0 corresponde a la frecuencia teórica que cumple, en una posición dada a lo largo del eje longitudinal del microcanal, con la condición de resonancia de la onda acústica en el microcanal y la formación de una onda estacionaria a lo largo de la dimensión transversal considerada.

- 15 La frecuencia de los pulsos de ondas acústicas presentes en todos o parte de los grupos de pulsos de ondas acústicas aplicados en la etapa b) puede estar comprendida entre $0,5f_0$ y $1,5f_0$, en particular entre $0,75f_0$ y $1,25f_0$.

- El generador de campo acústico puede estar sujeto a una de las paredes del microcanal. Esta sujeción puede realizarse usando cualquier medio conocido por el experto en la técnica según sea apropiado, en particular mediante encolado.

- 20 Una capa de un material de adaptación acústica puede estar presente entre el generador de campo acústico y al menos una de las paredes del microcanal.

- La adaptación acústica puede hacerse mediante el uso de cualquier material apropiado conocido por el experto en la técnica.

- 25 Una pluralidad de generadores de campo acústico pueden estar presentes a lo largo de la longitud del microcanal para generar dicho campo acústico pulsado modulado en la etapa b), estando presentes los generadores de campo acústico preferiblemente en el mismo lado del microcanal.

- 30 En una variante, los generadores de campo acústico están presentes en lados opuestos del microcanal.

Microcanal

- 35 Según la presente invención, es posible usar microcanales que se describen en el documento US 2008/0067128.

Características geométricas

- 40 La anchura y/o el grosor del microcanal pueden variar, opcionalmente disminuir, al menos en una parte de su longitud.

- Por tanto, al moverse a lo largo del eje longitudinal del microcanal, el grosor de dicho microcanal puede ser constante o puede variar. El microcanal puede comprender en particular al menos dos zonas que van axialmente una detrás de otra y que presentan diferentes grosores.

- 45 El microcanal puede presentar al menos en una parte de su longitud, en particular por la totalidad de su longitud, un grosor comprendido entre $50 \mu\text{m}$ y 1 mm , preferiblemente entre $100 \mu\text{m}$ y $500 \mu\text{m}$.

- 50 La anchura del microcanal puede, al moverse a lo largo del eje longitudinal de dicho microcanal, ser constante o variar. El microcanal, por ejemplo, presenta dos zonas que van axialmente una detrás de otra y que presentan diferentes anchuras.

- 55 Por "eje longitudinal del microcanal" quiere decirse la línea que interconecta los centros de gravedad de las secciones transversales del microcanal. El eje longitudinal del microcanal puede ser recto o curvilíneo y puede estar contenido en un plano, que puede ser un plano de simetría para algunas o incluso todas las secciones transversales del microcanal.

- En una realización, la anchura del microcanal puede variar y el microcanal puede tener una forma piramidal cuando se observa desde arriba. En este caso particular, los generadores de campo acústico pueden ser rectangulares o no.

- 60 En una variante, el microcanal puede, cuando se observa desde arriba, tener la forma de círculos conectados por submicrocanales, en particular submicrocanales rectilíneos.

En la última configuración, los generadores de campo acústico pueden ser cilíndricos, posibilitando dicha configuración en particular la generación de un mosaico de agregados.

- 5 El microcanal puede tener al menos por una parte de su longitud, en particular por la totalidad de su longitud, una anchura comprendida entre 1 mm y 40 mm, preferiblemente entre 5 mm y 20 mm.

La longitud del microcanal, medida a lo largo de su eje longitudinal, está, por ejemplo, comprendida entre 3 mm y 1000 mm, preferiblemente entre 10 mm y 500 mm.

- 10 El microcanal, por ejemplo, tiene una longitud de 100 mm, una anchura de 10 mm y un grosor de 0,4 mm.

- 15 Según otra realización a modo de ejemplo, la longitud del microcanal puede estar comprendida entre 10 mm y 1000 mm, la anchura del microcanal puede estar comprendida entre 1 mm y 40 mm y el grosor del microcanal puede estar comprendido entre 0,5 mm y 3 mm.

El microcanal puede comprender una sección transversal que es sustancialmente constante al desplazarse a lo largo de su eje longitudinal.

- 20 El microcanal puede tener al menos por una parte de su longitud, en particular por la totalidad de su longitud, una sección transversal rectangular.

En una variante, el microcanal puede tener al menos por una parte de su longitud, en particular por la totalidad de su longitud, una sección transversal cuadrada o circular.

- 25 El microcanal puede tener ventajosamente, al menos por una parte de su longitud, una relación de anchura/grosor y/o de longitud/grosor que es mayor de o igual a 10.

Tales relaciones pueden impedir ventajosamente efectos tridimensionales en el perfil de flujo.

- 30 En una realización preferida, el microcanal tiene, al menos por una parte de su longitud, en particular por la totalidad de su longitud, una sección transversal rectangular y una relación de anchura/grosor ≥ 10 .

Las paredes del microcanal pueden tener forma de plaqueta.

- 35 Las paredes del microcanal pueden tener al menos por parte, en particular por la totalidad, de su longitud un grosor comprendido entre 0,5 mm y 5 mm.

El microcanal puede comprender, al menos por una parte de su longitud, una pared cuyo grosor varía.

- 40 La pared opuesta a la pared en la que se genera el campo acústico puede oscilar libremente cuando se lleva a cabo el método según la invención.

Entrada(s) y salida(s)

- 45 El microcanal puede estar en comunicación fluídica con al menos una entrada.

El microcanal puede estar en comunicación fluídica con al menos una salida.

- 50 El microcanal que comprende una entrada y/o salida puede estar ubicado en un marco estable. La(s) entrada(s) y/o salida(s) del microcanal puede(n) estar conectada(s) a bombas de jeringa y/o bombas peristálticas. Cuando están conectadas a bombas peristálticas, puede añadirse un amortiguador hidrodinámico entre la bomba peristáltica y la(s) entrada(s) y/o salida(s) del microcanal.

- 55 El microcanal puede estar en comunicación fluídica con una o más salida(s), en la(s) que pueden evacuarse agregados, formados mediante el método según la invención.

Como tal, puede no ser necesario abrir el microcanal con el fin de recoger los agregados formados.

- 60 Preferiblemente, al menos una de la(s) entrada(s) presenta una anchura que no es menor que la anchura del microcanal y/o presenta una sección que es sustancialmente rectangular.

Al menos una entrada puede abrirse al microcanal sustancialmente en paralelo a o en perpendicular al eje longitudinal del mismo.

65

En una realización de la invención, al menos un orificio de alimentación está en comunicación fluidica con al menos una de la(s) entrada(s) por medio de un conducto, incluyendo el conducto en particular una parte divergente que diverge de una punta del conducto, abriéndose el orificio de alimentación al conducto adyacente a dicha punta, y en particular en perpendicular al conducto.

5 Esta parte divergente del conducto hace posible formar una lámina de sustancia partiendo de un punto de alimentación.

10 En una realización de la invención, al menos un orificio de salida está en comunicación fluidica con la(s) salida(s) del microcanal por medio de un conducto, incluyendo el conducto una parte de sección que se estrecha lateralmente, en particular una parte que converge hacia una punta, siendo dicha parte de forma triangular cuando se observa desde arriba, por ejemplo, abriéndose el orificio de salida al conducto, por ejemplo adyacente a la punta, y en particular en perpendicular al conducto.

15 Esta parte convergente del conducto puede servir para evitar la formación de un punto de estancamiento en el orificio de salida.

Materiales que constituyen el microcanal

20 Las paredes del microcanal pueden comprender, en particular consistir en, un material elegido entre: vidrios orgánicos o minerales, cuarzo, materiales termoplásticos, en particular PMMA o policarbonato, y metales. Más generalmente, es posible usar cualquier material que tenga una alta impedancia acústica, es decir al menos diez veces mayor que la impedancia acústica del fluido.

25 El microcanal puede fabricarse usando métodos de fabricación convencionales de la clase usada en el campo de la microfluidica.

Cuando sea apropiado, el microcanal puede estar dotado al menos de una válvula, por ejemplo una válvula de solenoide.

Líquido y objetos

El líquido puede ser un líquido biológico, tal como sangre.

35 En una variante, el líquido puede ser agua.

El líquido puede ser transparente a la luz visible.

40 El líquido puede no fluir durante la etapa b).

Según una realización, el líquido fluye durante la etapa b), siendo el número de Reynolds del flujo del líquido opcionalmente menor de 10.

45 Los objetos pueden ser células biológicas monodispersas o polidispersas, en particular células sanguíneas, por ejemplo células cancerosas en una muestra de sangre.

Los objetos pueden ser partículas rígidas o deformables, por ejemplo partículas de poliestireno.

50 Los objetos pueden ser células biológicas mono o polidispersas, preferiblemente una línea celular tumoral o no tumoral de mamífero, células madre o líneas celulares primarias.

El tamaño promedio de los objetos presentes en el microcanal puede ser menor de o igual a 100 μm , mejor 50 μm , más preferiblemente 25 μm .

55 Por "tamaño promedio" quiere decirse la dimensión granulométrica estadística a la mitad de la población, conocida como D50.

Las tasas de flujo usadas pueden depender de las muestras tratadas, el volumen de microcanal y las fuerzas acústicas aplicadas.

60 Por ejemplo, el líquido puede fluir durante todo o parte del método según la invención a una tasa de flujo comprendida entre 0,01 ml/min y 100 ml/min.

65 En una realización particular, el líquido puede fluir a una tasa de flujo de 0,1 ml/min para un microcanal de 1 ml de volumen, cuando la fuerza primaria acústica máxima es del mismo orden de magnitud que la fuerza de la gravedad, concretamente 1 pN (pico-Newton = 10^{-9}) para partículas de látex o células de 10 μm de diámetro.

La fracción en volumen de objetos, medida cuando se inyectan dichos objetos en el microcanal, puede ser del 0,1% (v/v) o más. La fracción en volumen de objetos corresponde al [(volumen de objetos)/(volumen de líquido que contiene dichos objetos)] x 100%.

5 Breve descripción de los dibujos

La invención se entenderá mejor a partir de una lectura de la descripción detallada a continuación, de ejemplos no limitativos para su implementación y a partir del examen de los dibujos adjuntos, en los que:

- 10 - la Figura 1 muestra un dispositivo para llevar a cabo un método según la invención,
- la Figura 2 muestra un agregado obtenido según un método de la invención,
- 15 - la Figura 3 es una vista según III-III del microcanal usado en la figura 1,
- las Figuras 4 y 5 muestran ejemplos de campos acústicos pulsados modulados para llevar a cabo un método según la invención,
- 20 - las Figuras 6 a 8 muestran otras realizaciones de dispositivos para llevar a cabo métodos según la invención,
- la Figura 9A es una fotografía de un agregado tridimensional de partículas de látex de 15 μm producidas en un modo de funcionamiento continuo,
- 25 - la Figura 9B es un gráfico que muestra la evolución del área superficial normalizada del agregado mostrado en la figura 9A,
- la Figura 9C es un gráfico que muestra la evolución de la velocidad temporal instantánea de crecimiento del área superficial normalizada del agregado mostrado en la figura 9A,
- 30 - la Figura 10A es una fotografía de un agregado bidimensional de partículas de látex de 15 μm producidas mediante un método de modo pulsado (es decir usando un método según la invención) a 250 pulsos y frecuencia de repetición de 5 kHz,
- 35 - la Figura 10B es un gráfico que muestra la evolución del área superficial normalizada del agregado mostrado en la figura 10A,
- la Figura 10C es un gráfico que muestra la evolución de la velocidad temporal instantánea de crecimiento del área superficial normalizada del agregado mostrado en la figura 10A,
- 40 - la Figura 11A es un gráfico que muestra la evolución del área superficial normalizada de un agregado de partículas de látex de 10 μm producidas en un modo de funcionamiento continuo (es decir sometiendo objetos a solo un grupo de pulsos que tienen sustancialmente la misma amplitud y frecuencia),
- 45 - la Figura 11B es un gráfico que muestra la evolución de la velocidad temporal instantánea de crecimiento del área superficial normalizada de un agregado de partículas de látex de 10 μm producidas en un modo de funcionamiento continuo,
- la Figura 12A es una fotografía de un agregado bidimensional de partículas de látex de 10 μm producidas mediante un método según la invención (modo pulsado a 100 pulsos y frecuencia de repetición de 4 kHz),
- 50 - la Figura 12B es un gráfico que muestra la evolución del área superficial normalizada del agregado mostrado en la figura 12A,
- 55 - la Figura 12C es un gráfico que muestra la evolución de la velocidad temporal instantánea de crecimiento del área superficial normalizada del agregado mostrado en la figura 12A,
- las Figuras 13A y 13B muestran respectivamente mediciones de área superficial de agregado celular producidas a concentraciones celulares baja (5×10^5 células/ml) y alta (3×10^6 células/ml) en un modo continuo y pulsado (50-200 pulsos),
- 60 - las Figuras 14A y 14B muestran respectivamente agregados de células Caco2 representativos (concentración 3×10^6 células/ml) producidos en un modo continuo y pulsado (50 pulsos y frecuencia de repetición de 4 kHz),

- las Figuras 15A y 15B muestran respectivamente las evoluciones en modos continuos y pulsados del área superficial normalizada y de la velocidad temporal instantánea de crecimiento del área superficial normalizada de un agregado de células Caco2 (3×10^6 /ml),

- 5 - las Figuras 16A y 16B muestran respectivamente agregados bidimensionales de partículas de 15 μ m obtenidas en un modo continuo a diferentes voltajes: a) 6 Vp-p y b) 4,5 Vp-p.

Descripción detallada

- 10 La Figura 1 muestra un dispositivo 1 que puede usarse en los métodos según la invención. El dispositivo 1 comprende un microcanal 2 que se extiende a lo largo de un eje longitudinal X.

El microcanal 2 puede presentar una sección transversal que es rectangular. En el ejemplo descrito, la relación de longitud/grosor del microcanal 2 es mayor de 10.

- 15 El microcanal 2 tiene paredes inferior y superior 3 y 4. Tal como se muestra en la figura 1, por ejemplo, un líquido portador L y una pluralidad de objetos O están presentes en el microcanal 2.

- 20 Los objetos O pueden ser mono o polidispersos, dichos objetos O pueden ser células biológicas y el líquido L puede ser un líquido biológico tal como, por ejemplo, sangre.

La inyección de objetos O en el microcanal 2 puede controlarse en frecuencia y en tasa de flujo para posibilitar que el dispositivo 1 funcione de manera continua con el fin de procesar grandes volúmenes de objetos.

- 25 El dispositivo 1 está dotado además de un generador de campo acústico 10 que, tal como se muestra, está sujeto a la pared superior 4 del microcanal 2. El generador de campo acústico 10 posibilita la formación, en la etapa b), de un agregado 20 de objetos O sometidos a un campo acústico pulsado modulado en amplitud. El agregado formado 20 tiene, tal como se muestra en la figura 3, superficies superior e inferior S_u y S_i .

- 30 Tal como se muestra en la figura 1, el agregado 20 está en levitación alrededor del nodo de presión de las ondas generadas por el generador de campo acústico 10. El campo acústico pulsado modulado producido por el generador de campo acústico 10 puede permitir la formación de una onda acústica estacionaria a lo largo del grosor del microcanal 2 (eje Z). El agregado 20, tal como se muestra en la figura 1, no está en contacto con las paredes 3 y 4 durante la etapa b).

- 35 La expresión "levitación acústica" se emplea cuando la manipulación acústica pretende poner objetos en una posición de equilibrio en contra de la gravedad. La posición de equilibrio depende de las propiedades acústicas de los objetos y el líquido de suspensión, la potencia acústica y la posición y el número de nodos de las ondas acústicas.

- 40 El generador de campo acústico 10 puede suministrarse mediante una señal de un generador D, que comprende por ejemplo un generador de ondas conectado a un amplificador. El generador D puede suministrar al generador de campo acústico 10 grupos de pulsos de voltaje de forma sinusoidal. En una variante, el generador de campo acústico 10 puede suministrarse mediante el generador D con grupos de pulsos de voltaje de forma triangular o de forma cuadrada.

- 45 Tal como se explicó anteriormente, un agregado de objetos puede ser más compacto que una capa de objetos. La Figura 2 muestra una vista desde arriba de un agregado 20 obtenido al final de la etapa b) según la invención. El agregado 20 comprende un conjunto de objetos O que están en contacto entre sí, por ejemplo al menos el 50% de los objetos O que constituyen dicho agregado 20 pueden estar en contacto entre sí.

La invención puede posibilitar la formación de agregados bidimensionales y/o tridimensionales. La definición de tales agregados bidimensionales y tridimensionales se facilita más adelante.

- 55 El agregado 20 comprende una sucesión 20i de objetos O al moverse a lo largo del eje Y que corresponde a un desplazamiento a lo largo de la anchura del microcanal 2 pero tiene un grosor formado por al menos un objeto. En este caso, el agregado 20 es un agregado bidimensional.

- 60 En una realización, el agregado comprende también una sucesión de objetos O al moverse a lo largo del grosor del microcanal 2. El agregado es por tanto un agregado tridimensional.

Tal como se muestra en la figura 3, una capa de un gel 11 que actúa como adaptador de impedancia acústica puede estar presente entre el generador de campo acústico 10 y la pared superior 4 del microcanal 2.

- 65 La Figura 4 muestra un ejemplo de una evolución temporal de una señal que corresponde a un campo acústico pulsado modulado en amplitud que puede usarse en la etapa b) según la invención.

5 El campo acústico pulsado modulado puede, tal como se muestra, comprender una repetición de una pluralidad de grupos 50 de pulsos de ondas acústicas 51, teniendo dichos pulsos 51, entre un grupo 50 dado, sustancialmente la misma amplitud y frecuencia, y estando dichos grupos 50 separados entre sí por un periodo 60 que tiene una duración distinta de cero, en el que no se aplica ninguna onda acústica.

Cada uno de los grupos 50 de pulsos de ondas acústicas 51 puede comprender 10 o más, preferiblemente 25 o más, preferiblemente 50 o más, preferiblemente 100 o más, pulsos de ondas acústicas 51.

10 La totalidad de los grupos 50 de pulsos de ondas acústicas 51 puede durar una duración t_1 que es mayor de o igual a 0,01 ms, preferiblemente a 0,025 ms.

15 La totalidad de los periodos 60 que separan dos grupos sucesivos 50 de pulsos de ondas acústicas 51 pueden tener una duración t_2 que es mayor de o igual a 0,05 ms, preferiblemente 0,1 ms, más preferiblemente a 0,2 ms.

La totalidad de los periodos 60 que separan dos grupos sucesivos 50 de pulsos de ondas acústicas 51 pueden tener una duración t_2 que es menor de o igual a 0,5 s, preferiblemente a 0,1 s, más preferiblemente a 0,01 s, más preferiblemente a 0,005 s.

20 La presente divulgación abarca también el uso de variantes de campo acústico pulsado modulado, en las que se aplica una onda acústica durante un periodo que separa dos grupos de pulsos.

25 Una realización de este tipo se muestra en la figura 5, en la que dos grupos sucesivos 50 de pulsos de ondas acústicas 51 están separados por un periodo 60, en el que se aplica una onda acústica. La onda acústica aplicada durante el periodo 60 tiene, tal como se muestra, la amplitud más alta, que es menor que la amplitud más alta de los pulsos de ondas acústicas 51 de los grupos 50.

30 Tal como se muestra en la figura 5, el promedio temporal del valor absoluto de la amplitud de la onda acústica aplicada durante el periodo 60, correspondiendo dicho promedio temporal a la línea horizontal dibujada, es menor del 50% y por ejemplo aproximadamente igual al 25% de la amplitud de pulsos más alta 51 en los grupos 50.

La Figura 6 muestra una variante de un dispositivo 1 para llevar a cabo un método según la invención.

35 En esta realización, se crea un agregado 20 sometiendo objetos O a un campo acústico pulsado modulado producido mediante un generador de campo acústico 10.

40 Un dispositivo 100 está presente y permite la medición de al menos una característica del agregado 20. Por ejemplo, el dispositivo 100 puede permitir la medición de la velocidad temporal instantánea de crecimiento del área de la superficie inferior S_i del agregado 20.

45 Dicho dispositivo, por ejemplo, comprende un microscopio, que permite la captura de imágenes en la dirección de propagación del sonda (eje z negativo) conectado a un ordenador convencional, que está equipado con cualquier software adecuado que permita la estimación de la velocidad temporal instantánea de crecimiento del área de la superficie inferior S_i del agregado 20 (por ejemplo el software de obtención y procesamiento de imágenes Cell-D (Soft Imaging System, SIS, GmbH) o el software Image J).

50 Esta característica medida se transmite entonces a un dispositivo T que controla la modificación de al menos una característica del campo acústico pulsado modulado en función de dicha característica medida. El dispositivo T, por ejemplo, controla la modificación de la amplitud y/o frecuencia de los pulsos en los grupos y/o la duración de los periodos que separan dos grupos sucesivos.

Ejemplos

Materiales y métodos

55 *Trampa ultrasónica*

60 La trampas construidas internamente 1 empleadas se muestran en las figuras 7A (vista desde arriba de la primera trampa empleada), 7B (vista lateral del dispositivo de la figura 7A), 7C (vista desde arriba de la segunda trampa empleada) y 7D (vista lateral del dispositivo de la figura 7C).

65 Estas trampas tienen cuatro capas; un transductor 10 (PZ26 Ferroperm, Kvistgard, Dinamarca) resonante de manera nominal en el modo de grosor a 3 MHz y montado en una carcasa simétrica radialmente, una capa de acero 14 que acopla el ultrasonido a una capa acuosa de mitad de longitud de onda ($\lambda/2$ o 0,25 mm de profundidad, donde λ es la longitud de onda del sonido en agua a 3 MHz) y un reflector acústico 4, hecho por ejemplo de cuarzo, que proporcionaba acceso óptico desde arriba.

Se define una cavidad resonante 5 mediante un espaciador de poli(tereftalato de etileno) (Mylar®) o poliimida 5a.

5 También es posible usar un reflector acústico hecho de un material de plástico y/o sustituir la capa de acero 14 por una capa hecha de cuarzo o un material de plástico.

El tamaño del cuerpo de acero cilíndrico era de 35 mm. La cavidad resonante 5 puede tener un diámetro comprendido entre 1 mm y 20 mm. El transductor de disco (12 mm de diámetro) 10 se accionó a 2,13 MHz.

10 La trampa 1 mostrada en las figuras 7A y 7B tiene una entrada de muestra 6 y una salida de muestra 7. Las trampas 1 están dotadas adicionalmente de conectores 8 para la conexión a un generador de voltaje. Cada uno de los conectores 8 está conectado eléctricamente a una cara de transductor 10. Uno de los conectores 8 está, tal como se muestra, en contacto con la capa de acero 14, el contacto eléctrico con la cara del transductor 10 sujeta a la capa 14 se garantiza mediante una capa de epoxi conductora (no mostrada).

15 La trampa 1 mostrada en las figuras 7C y 7D no comprende ninguna entrada ni salida.

20 Obsérvese que la frecuencia de resonancia nominal del transductor 10 (3 MHz) es diferente de la frecuencia de resonancia nominal del resonador (2,13 MHz) debido a la capa de acoplamiento de acero 14. El reflector acústico 4 puede tener un grosor de 0,5 mm, 1 mm o 2 mm y puede estar hecho de vidrio, en particular vidrio de cuarzo.

25 El transductor piezocerámico 10 se accionó mediante un generador de ondas arbitrarias de microcanal doble de 100 MHz (5062 Tabor Electronics, Israel) y la señal se amplificó mediante un amplificador de 100 MHz de banda ancha diferencial doble (9250 Tabor Electronics, Israel). La señal se visualizó con un osciloscopio de memoria digital (IDS 8064 60 MHz ISOTECh, Hanan - Israel).

30 En experimentos con ultrasonido continuo y pulsado, se emplearon amplitudes de 5 a 15 V_{p-p} . En cuanto a los campos acústicos pulsados usados, el número de pulsos entre cada grupo varió entre 25-250 y la frecuencia de repetición de los grupos desde 1 hasta 5 kHz.

Sistema óptico

35 Un instrumento XM10 de alta resolución, rápido (Soft Imaging System, SIS, GmbH) montado en un microscopio de epifluorescencia de reflexión Olympus BX51M permitió la observación en la dirección de propagación del sonido (eje z negativo) (véase la figura 8).

Se capturaron imágenes mediante un ordenador convencional equipado con el software de obtención y de procesamiento de imágenes Cell-D (Soft Imaging System, SIS, GmbH).

40 *Suspensiones de perlas de látex de poliestireno*

Se usaron partículas de látex de poliestireno de 15 y 10 μm de diámetro (densidad 1,056 kg/m^3) suministradas como una suspensión al 10% de sólidos de Micromod (Rostock, Alemania). Se diluyeron alícuotas en este caso hasta 45 20 ml para dar aproximadamente un 0,15% de sólidos en agua desionizada.

Cultivo celular

50 Se obtuvieron células Caco2 (adenocarcinoma colorrectal epitelial humano) de la Facultad de Farmacia y Ciencias Farmacéuticas, Trinity College Dublin, Irlanda.

Se mantuvieron las células como un cultivo replicativo a 37°C bajo una atmósfera del 95% de aire y del 5% de CO_2 . Se cultivaron células Caco2 en medio Eagle modificado (MEM) complementado con disolución de penicilina-estreptomicina 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, piruvato de sodio 0,05 g/l y suero de ternero fetal (FCS) al 10%. A la confluencia, se trataron las células con disolución de tripsina/EDTA (1X), durante 10 min para liberar las células de la superficie del 55 matraz de cultivo.

60 Se filtraron las células a través de un tamiz colector de células Nitex de 40 μm (FALCON) para garantizar una suspensión celular única. Entonces se sedimentaron las células mediante centrifugación a 2000 rpm durante 5 min, volvieron a suspenderse en medio MEM libre de suero nuevo (que contenía todos los complementos mencionados anteriormente), se contaron y finalmente se diluyeron hasta concentraciones de 5×10^5 células/ml y 3×10^6 células/ml.

Procedimiento experimental

65 Puede usarse una bomba peristáltica Gilson minipuls3 (Gilson, Inc. Middleton, EE. UU.) para bombear la muestra al interior de la trampa ultrasónica.

Se enfocó previamente el microscopio sobre el plano central de la trampa en la región axial. Cuando se usaba una bomba, se desconectó la bomba y se inició inmediatamente la exposición a ultrasonidos. Se observó el proceso de agregación usando objetivos de 5x, 10x y 20x.

5 El enfoque de ultrasonidos pulsados usado consistió en la generación de grupos de pulsos (un pulso es un periodo) a una cierta frecuencia de repetición (véase por ejemplo la figura 4). Por ejemplo, a 2 MHz, un pulso dura 500 ns; y normalmente pueden usarse 100 periodos, que duran $t_1 = 0,05$ ms, separados por un tiempo de repetición $t_2 = 1$ ms.

10 Esto significa que para un experimento que dura 1 min, cada ciclo de encendido-apagado dura $t_{ciclo} = 1,05$ ms, conduciendo a aproximadamente 57.143 ciclos de encendido-apagado durante el experimento. El tiempo total en el que la fuerza está encendida será entonces de $\sim 2,86$ segundos, es decir \sim el 5% del tiempo total. Para las

$$P_{mf} = \frac{t_1}{t_1 + t_2},$$

condiciones notificadas anteriormente, el factor de modo de pulso P_{mf} , definido como es igual a 0,05.

15 Una de las motivaciones para emplear ultrasonido pulsado, además de controlar el proceso de agregación, es evitar el calentamiento del transductor; un número mínimo de pulsos satisface este requisito.

20 Además, un número mínimo de pulsos permitirá aumentar la fuerza acústica aumentando el voltaje, reduciendo de ese modo el riesgo de daño del transductor. A su vez, también se reduce el riesgo de calentamiento del líquido, manteniendo las propiedades termodinámicas y fisicoquímicas de la suspensión tan estables como sea posible.

25 Usando ultrasonido de modo pulsado es posible modificar la velocidad de agregación controlando el número de pulsos y la frecuencia de repetición. De hecho, los inventores asumen que en el modo continuo, las partículas y las células tienen la velocidad transversal máxima en el plano nodal, mientras que en el modo pulsado se ralentizan de manera controlada.

Resultados experimentales

30 El proceso de agregación comienza cuando partículas aisladas en levitación convergen en un punto específico, en el que la energía acústica es máxima.

35 En el resonador usado, se obtuvo levitación de células cancerosas en todas las frecuencias en el intervalo de 2,1 y 2,4 MHz, pero la agregación óptima comenzó cuando la frecuencia era de 2,13 MHz, frecuencia a la que el proceso de agregación se produjo muy rápidamente.

40 Por otro lado, cuando la frecuencia estaba cerca, pero no en la frecuencia de resonancia óptima, se formaron varios agregados pequeños en diferentes posiciones en el plano de levitación. Por ejemplo, para células cancerosas, el funcionamiento a la frecuencia de agregación (2,13 MHz) y a la amplitud 10 V_{p-p} permitió que el agregado alcanzase su tamaño máximo en el plazo de 10 s, como se demostrará a continuación.

Fuerza de campo acústico pulsado

45 Inicialmente, se inyectaron partículas o células en el resonador, en el que llenaron homogéneamente la cámara de 45 μ l de volumen. Entonces se detuvo el flujo, se estabilizaron las partículas y entonces se encendió el campo acústico.

Se variaron el número de pulsos y la frecuencia de repetición mientras se mantenían los otros parámetros constantes para investigar el efecto de un campo acústico pulsado modulado para la formación de agregados.

50 La vibración del transductor tiene la amplitud máxima a la frecuencia de resonancia (la amplitud de vibración del transductor es de unos pocos nm y la velocidad de vibración de unos pocos cm/s), pero la energía no se distribuye uniformemente y tiene una intensidad máxima en el centro.

55 La fuerza de Bernoulli generada por este efecto, así como por otras imperfecciones del resonador, actúa sobre las partículas impulsándolas hacia la zona de energía máxima, conduciendo por tanto a la generación de un único agregado. El hecho de que en el modo pulsado también se observe un único agregado indica que la frecuencia de resonancia no cambia con respecto al modo continuo.

60 En todos los experimentos se pretendió formar agregados de tamaños similares (diámetro máximo \sim 2 mm).

Agregados de partículas

Se hizo una estimación de la fuerza acústica transversal responsable de la agregación, midiendo (usando el software: <http://www.cabrillo.edu/~dbrown/tracker/>) la velocidad de migración de una partícula en el plano de enfoque en el modo continuo y pulsado a la frecuencia de resonancia de 2,13 MHz.

- 5 En el modo continuo, las partículas de látex 10 μm y 15 μm individuales tenían velocidades transversales promedio de $u_{Tr10} = 2 \times 10^{-5}$ m/s (a 13,8 V_{p-p}) y $u_{Tr15} = 1,3 \times 10^{-5}$ m/s (a 16 V_{p-p}) respectivamente. Las respectivas fuerzas transversales promedio son $F_{Tr} = 1,8 \times 10^{-12}$ N y 2×10^{-11} N; estos valores son, tal como se indicó anteriormente, al menos dos órdenes de magnitud más pequeños que la fuerza de radiación primaria.
- 10 La Figura 9A muestra un agregado tridimensional de partículas de látex de 15 μm formado en modo continuo. El área superficial del agregado de partículas normalizada crece de manera monótona con el tiempo mostrando fluctuaciones de área superficial (véase la figura 9B). El proceso de agregación se completó en 18 s. El voltaje usado fue de 16 V_{p-p}.
- 15 La Figura 9C (derivada en el tiempo del área superficial normalizada) muestra la velocidad temporal instantánea de crecimiento del área superficial normalizada, el pico más intenso aparece a los 7 s. El agregado resultante formado es tridimensional. El voltaje usado era de 16 V_{p-p}.

20 Cuando se empleó ultrasonido pulsado para partículas de 15 μm , a 250 pulsos y una frecuencia de repetición de 5 kHz, la velocidad de partícula promedio era de $u_{Tr15 \text{ pulsado}} \sim 3,5 \times 10^{-6}$ m/s, que corresponde a una fuerza acústica transversal $F_{Tr} \sim 2 \times 10^{-13}$ N; siendo la última mucho menor que la obtenida en modo continuo. El voltaje usado era de 16 V_{p-p}.

25 Se formó un agregado bidimensional (véase la figura 10A). El área superficial aumentó linealmente con el tiempo (véase la figura 10B), y las fluctuaciones eran mucho menores que las observadas en el modo continuo. La velocidad temporal instantánea de crecimiento del área superficial normalizada del agregado muestra fluctuaciones muy pequeñas (cerca de cero) (véase la figura 10C).

30 También se generaron agregados tridimensionales y bidimensionales de partículas de látex de 10 μm , en modo continuo y en modo pulsado a 100 pulsos y una frecuencia de repetición de 4 kHz. El voltaje usado en estos experimentos fue de 13,8 V_{p-p}.

35 La velocidad de partícula en el modo pulsado era del orden de $u_{Tr10 \text{ pulsado}} \sim 4 \times 10^{-6}$ m/s, mucho menor que en modo continuo, lo que corresponde a una fuerza transversal $F_{Tr} \sim 4 \times 10^{-13}$ N.

La agregación en modo pulsado terminó tras 300 s, cuando el agregado tenía aproximadamente 2 mm de diámetro. Las Figuras 11A y 11B muestran las evoluciones del área superficial de agregado normalizada y de la velocidad temporal instantánea de crecimiento del área superficial de agregado normalizada.

40 Se observaron características análogas a las de las partículas de 15 μm . Sin embargo, el crecimiento del área superficial de agregado normalizada en modo continuo (véase la figura 11A) mostró un aumento rápido inicial (durante los primeros 4 s), y entonces disminuyó hasta volverse finalmente lineal.

45 La velocidad temporal instantánea de crecimiento del área superficial de agregado normalizada, alcanzó un pico en el plazo de un segundo durante el proceso de agregación, seguido de una suave disminución; estas características fueron más pronunciadas para partículas de 10 μm que para partículas de 15 μm (véase la figura 11B).

50 En el modo pulsado, se obtuvo un agregado bidimensional (véase la figura 12A), el crecimiento del área superficial del agregado era lineal (véase la figura 12B) y las velocidades temporales instantáneas de crecimiento del área superficial de agregado normalizada eran insignificantes en comparación con las del modo continuo (véase la figura 12C).

Agregados de células

55 Para la agregación de células, se variaron diferentes parámetros experimentales incluyendo la concentración de células, el número de pulsos, el tiempo de repetición y el voltaje.

60 El tamaño de célula típico era de 20 μm y las velocidades típicas eran de 223 $\mu\text{m/s}$ en el modo continuo y de 147 $\mu\text{m/s}$ en el modo pulsado, que corresponden a fuerzas acústicas de $\sim 12 \times 10^{-11}$ N y $\sim 5,5 \times 10^{-11}$ N respectivamente.

65 Los histogramas en las figuras 13A y 13B muestran todos los parámetros y las condiciones en las que se generaron agregados tridimensionales y bidimensionales. El voltaje usado para experimentos en régimen pulsado era de 10 V_{p-p}. A menos que se especifique lo contrario en las figuras, el tiempo de repetición de pulso (periodo que separa dos grupos de pulsos) usado en los experimentos de modo pulsado era de 250 μs .

5 Las Figuras 13A y 13B muestran respectivamente mediciones de área superficial de agregado celular producidas a concentraciones de células baja (5×10^5 células/ml) y alta (3×10^6 células/ml) en un modo continuo y pulsado (50-200 pulsos). También se indican la arquitectura de agregado de células final (bidimensional o tridimensional) y el tiempo de repetición de pulso.

En las figuras 14A y 14B se muestran agregados de células tridimensionales y bidimensionales representativos bajo ultrasonido continuo y pulsado.

10 En las figuras 15A y 15B se ilustran respectivamente las evoluciones del área superficial de agregado normalizada y de la velocidad temporal instantánea de crecimiento del área superficial de agregado normalizada. El voltaje usado era de 10 Vp-p.

15 En el modo continuo, el área superficial de agregado normalizada de células siguió el mismo patrón que para agregados de partículas de $10 \mu\text{m}$; un aumento rápido del área superficial en el primer segundo va seguido por un crecimiento lineal.

20 Por el contrario, en el modo pulsado el crecimiento fue más lento y siguió un patrón lineal. Esto fue cierto para todas las condiciones de ultrasonido pulsado usadas en este caso. Las velocidades de crecimiento en modo continuo mostraron un pico inicial y entonces disminuyeron hasta converger con las curvas obtenidas para las diferentes condiciones de ultrasonido pulsado; raras veces se observaron picos en las curvas de modo pulsado y eran aún mucho más pequeños que los observados en el modo continuo.

25 Discusión

Inicialmente se demostró cómo el ultrasonido pulsado puede controlar la agregación de partículas y de células. Tal como se demostró anteriormente, las velocidades de crecimiento de agregados se redujeron cuando se emplea ultrasonido pulsado.

30 El factor de modo de pulso para partículas de 15 y $10 \mu\text{m}$: $P_{mf15} = 0,19$ y $P_{mf10} = 0,16$ indica que la fuerza acústica se aplicó durante el 19% y el 16% del tiempo experimental total respectivamente.

35 Considerando que las partículas tienen una velocidad transversal constante y teniendo en cuenta que la fuerza de resistencia es proporcional a la velocidad, puede compararse P_{mf} con la relación de velocidad: $U_{\text{pulsado}}/U_{\text{continuo}}$, siendo de 0,24 para las partículas de $15 \mu\text{m}$ y de 0,2 para las partículas de $10 \mu\text{m}$, no muy diferente de su respectivo factor de modo pulsado.

40 Este resultado sugiere que los efectos inerciales, es decir el tiempo necesario para alcanzar la velocidad terminal y la relajación de la amplitud máxima relacionada con el factor Q, no influyen significativamente en el proceso de agregación en modo pulsado.

En el caso opuesto, los valores para la relación de velocidad serían menores que la P_{mf} .

45 El hecho de que en modo pulsado la agregación es más lenta que en modo continuo no implica directamente que las tasas de crecimiento menores conlleven una probabilidad mayor de obtener agregados bidimensionales en vez de tridimensionales; de hecho, es necesario tener en cuenta la concentración de partículas o de células inicial.

50 Merece la pena observar que en el modo continuo, durante el proceso de agregación, casi todas las partículas alcanzaron el plano de enfoque antes de agregarse (solo unas pocas partículas se unieron al agregado desde el fondo del resonador, y su contribución a la estructura tridimensional era insignificante), mientras que en el modo pulsado, todas las partículas comenzaron a agregarse en el plano de enfoque.

55 Nuestros experimentos mostraron que cuando el agregado estaba creciendo, el momento transmitido por las partículas entrantes dio lugar a reajustes de partículas y células, lo que indica que se modificó la distribución de la presión en el agregado.

60 Cuando la presión era suficientemente alta, las partículas o capas comenzaron a solaparse, en su mayor parte en la parte central del agregado, conduciendo a fluctuaciones de la tasa de crecimiento de área superficial tal como se ilustra en la figura 9C y la figura 12C.

65 Como en esos experimentos solo pocas partículas se unieron al agregado desde otro sitio distinto del plano de levitación, es posible concluir que el solapamiento de las capas de partículas y de células se generó mediante el aumento de presión de las partículas entrantes, determinando por tanto la transición de agregados bidimensionales a tridimensionales.

Los experimentos con partículas mostraron claramente un solapamiento de capas (véase la figura 9A), mientras que los agregados de células mostraron capas más bien más oscuras (véase la figura 14A). El proceso de agregación mostró que las fluctuaciones en el área superficial del agregado coincidían con el solapamiento de las capas. Estas fluctuaciones desaparecieron en el ultrasonido pulsado, en el que solo se formaron agregados bidimensionales. En la figura 10C (modo pulsado, partículas de 15 μm), se observó una fluctuación grande, pero todavía más pequeña que aquellas durante el modo continuo. De hecho, en este caso se observó un agregado pequeño que alcanzaba el agregado grande, generando por tanto una gran presión y un fuerte reajuste de partículas; sin embargo, el agregado era bidimensional (véase la figura 10A).

10 Este nuevo método se desarrolla con el propósito de generar constructos de células controlados.

Cuando se emplearon células, incluso aunque eran visibles fluctuaciones del área superficial, el proceso no mostró fluctuaciones rápidas. Es importante observar que las células son más elásticas que las partículas, por tanto inicialmente se produjo una compactación de los agregados con un aumento de presión antes de la formación de capas de células.

La curva de la velocidad de crecimiento del área superficial del agregado en ultrasonido continuo se ilustra en la figura 15A. La curva muestra un máximo análogo al mostrado para partículas de 10 μm , lo que sugiere que un máximo en la velocidad temporal instantánea de crecimiento del área superficial puede indicar la formación de una estructura tridimensional. Cuando se emplean células, el agregado no crece linealmente con el tiempo. Las propiedades elásticas de las células así como su polidispersidad pueden explicar este efecto.

Finalmente, los histogramas en las figuras 13A y 13B indican que el área de los agregados de células es una función del número de pulsos empleados para ambas concentraciones estudiadas.

Pueden formarse constructos bidimensionales de diferentes tamaños con suspensiones de concentraciones de células iniciales muy diferentes; por ejemplo, 5×10^5 células/ml a 200 pulsos genera agregados más pequeños que 3×10^6 células/ml a 50 pulsos. Independientemente de la concentración inicial, la técnica de ultrasonido pulsado permite formar agregados tridimensionales o bidimensionales.

Por tanto, el ultrasonido pulsado introduce nuevos parámetros para controlar el proceso de agregación.

Se investigó la posibilidad de generar agregados bidimensionales en modo continuo reduciendo la amplitud de la fuerza acústica, es decir reduciendo el voltaje. Se realizaron experimentos con partículas de látex de 15 μm (el 0,1% de sólidos en agua).

Reduciendo el voltaje a 9 Vp-p, 6 Vp-p y 4,5 Vp-p, se observó un aumento en la duración del tiempo de agregación, tal como se esperaba. A 9 Vp-p, el agregado era todavía tridimensional. A 6 Vp-p, el agregado era en su mayor parte bidimensional (véase la figura 16A), ya que era difícil distinguir si todas las partículas estaban en el mismo plano en el centro del agregado. A 4,5 Vp-p, el agregado era bidimensional, pero en el centro una forma cóncava mostraba que el agregado no estaba en un plano (véase la figura 16B). También se observó que el tiempo de agregación era el doble del tiempo de agregación en el modo pulsado.

A 6 Vp-p y 4,5 Vp-p, el agregado parece bidimensional pero, en el centro, las partículas no están enfocadas, y el agregado no está en un plano. A voltajes superiores el agregado es tridimensional.

Finalmente, comparando los agregados bidimensionales obtenidos a voltaje reducido y en modo pulsado (véase la figura 10A) puede verse que en modo pulsado el agregado es plano y regular.

Basándose en estas observaciones, puede considerarse que cuando se reduce el voltaje en el modo continuo para controlar la agregación, es difícil obtener un voltaje preciso para generar el agregado bidimensional óptimo o requerido.

La expresión "que comprende un/una" debe entenderse como "que comprende al menos un/una".

La expresión "comprendido/a entre ... y ..." debe entenderse con los puntos de extremo incluidos.

REIVINDICACIONES

- 1.- Un método de formación de un agregado (20) de objetos (O) en un microcanal (2) que comprende un líquido (L), comprendiendo dicho método:
- 5 a) proporcionar objetos (O) en al menos una región del microcanal (2), y
- b) formar un agregado (20) de dichos objetos (O) sometiénolos a un campo acústico pulsado modulado,
- 10 en el que el campo acústico pulsado modulado aplicado en la etapa b) está modulado en amplitud, siendo el número de Reynolds del flujo preferiblemente de 10 o menor durante la etapa b), siendo los objetos partículas rígidas o deformables, partículas polidispersas, células biológicas, bacterias, emulsiones coloidales o no coloidales, proteínas o liposomas.
- 15 2.- Un método según la reivindicación 1, en el que el campo acústico pulsado modulado comprende una repetición de una pluralidad de grupos (50) de pulsos de ondas acústicas (51), teniendo dichos pulsos (51), entre un grupo (50) dado, sustancialmente la misma amplitud y frecuencia, y estando separados dichos grupos (50) entre sí por un periodo (60) que tiene una duración distinta de cero, en el que no se aplica ninguna onda acústica.
- 20 3.- Un método según la reivindicación 1, en el que el campo acústico pulsado modulado comprende una repetición de una pluralidad de grupos (50) de pulsos de ondas acústicas (51), teniendo dichos pulsos (51), entre un grupo (50) dado, sustancialmente la misma amplitud y frecuencia, y estando separados dichos grupos (50) entre sí por un periodo (60) que tiene una duración distinta de cero, en el que se aplica una onda acústica, teniendo dicha onda acústica al menos un extremo del valor absoluto de su amplitud que es diferente de la amplitud más alta de los pulsos de ondas acústicas que pertenecen al grupo justo anterior a dicho periodo.
- 25 4.- Un método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que se crea una onda acústica estacionaria a lo largo de una dimensión transversal (w ; t) del microcanal (2) en la etapa b) durante la aplicación del campo acústico pulsado modulado, en el que dicha dimensión transversal es preferiblemente el grosor (t) del microcanal (2).
- 30 5.- Un método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, comprendiendo el campo acústico pulsado modulado una repetición de una pluralidad de grupos (50) de pulsos de ondas acústicas (51), teniendo dichos pulsos (51), entre un grupo (50) dado, sustancialmente la misma amplitud y frecuencia, y comprendiendo cada uno de dichos grupos (50) de pulsos de ondas acústicas (51) 10 o más pulsos de ondas acústicas (51), comprendiendo cada uno de dichos grupos (50) de pulsos de ondas acústicas (51) preferiblemente 25 o más pulsos de ondas acústicas (51), mejor 100 o más pulsos de ondas acústicas (51), incluso mejor 100 o más pulsos de ondas acústicas (51).
- 35 6.- Un método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, comprendiendo el campo acústico pulsado modulado una repetición de una pluralidad de grupos (50) de pulsos de ondas acústicas (51), teniendo dichos pulsos (51), entre un grupo (50) dado, sustancialmente la misma amplitud y frecuencia, durando al menos un grupo (50) de pulsos de ondas acústicas (51) una duración t_1 que es mayor de o igual a 0,01 ms, preferiblemente a 0,025 ms, , en el que al menos el 25%, mejor al menos el 50%, mejor el 75% o el 100% de los grupos (50) de pulsos de ondas acústicas (51), dura preferiblemente una duración t_1 que es mayor de o igual a 0,01 ms, preferiblemente a 0,025 ms.
- 40 45 7.- Un método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, comprendiendo el campo acústico pulsado modulado una repetición de una pluralidad de grupos (50) de pulsos de ondas acústicas (51), teniendo dichos pulsos (51), entre un grupo (50) dado, sustancialmente la misma amplitud y frecuencia, y comprendiendo la etapa b) someter los objetos (O) a al menos 100 grupos (50) de pulsos de ondas acústicas (51), en el que la etapa b) comprende preferiblemente someter los objetos (O) a al menos 500 grupos (50) de pulsos de ondas acústicas (51), lo más preferiblemente al menos 1000 grupos (50) de pulsos de ondas acústicas (51), incluso mejor al menos 5000, 10000, 25000 o 50000 grupos (50) de pulsos de ondas acústicas (51).
- 50 55 8.- Un método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, comprendiendo el campo acústico pulsado modulado una repetición de una pluralidad de grupos (50) de pulsos de ondas acústicas (51), teniendo dichos pulsos (51), entre un grupo (50) dado, sustancialmente la misma amplitud y frecuencia, y teniendo al menos un periodo (60) que separa dos grupos sucesivos (50) de pulsos de ondas acústicas (51) una duración t_2 que es mayor de o igual a 0,05 ms, preferiblemente 0,1 ms, más preferiblemente a 0,2 ms, en el que al menos el 25%, mejor al menos el 50%, el 75% o el 100% de los periodos (60) que separan dos grupos sucesivos (50) de pulsos de ondas acústicas (51) tienen preferiblemente una duración t_2 que es mayor de o igual a 0,05 ms, preferiblemente 0,1 ms, más preferiblemente a 0,2 ms.
- 60 65 9.- Un método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, comprendiendo el campo acústico pulsado modulado una repetición de una pluralidad de grupos (50) de pulsos de ondas acústicas (51), teniendo dichos pulsos (51), entre un grupo (50) dado, sustancialmente la misma amplitud y frecuencia, y teniendo al menos un periodo (60)

que separa dos grupos sucesivos (50) de pulsos de ondas acústicas (51) una duración t_2 que es menor de o igual a 0,5 s, preferiblemente a 0,1 s, más preferiblemente a 0,01 s, más preferiblemente a 0,005 s, en el que al menos el 25%, mejor al menos el 50%, el 75% o el 100% de los periodos (60) que separan dos grupos sucesivos (50) de pulsos de ondas acústicas (51) tienen preferiblemente una duración t_2 que es menor de o igual a 0,5 s, preferiblemente a 0,1 s, más preferiblemente a 0,01 s, más preferiblemente a 0,005 s.

10.- Un método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, comprendiendo el campo acústico pulsado modulado una repetición de una pluralidad de grupos (50) de pulsos de ondas acústicas (51), teniendo dichos pulsos (51), entre un grupo (50) dado, sustancialmente la misma amplitud y frecuencia, y en el que al menos un par de grupo consecutivo (50) de pulsos de ondas acústicas (51) de duración t_1 y periodo (60) que separa dos grupos

$$P_{mf} = \frac{t_1}{t_1 + t_2}$$

sucesivos (50) de pulsos de ondas acústicas (51) de duración t_2 tienen un factor de modo de pulso que es mayor de o igual a 0,01, preferiblemente 0,025, más preferiblemente 0,1, en el que preferiblemente al menos el 25%, mejor al menos el 50%, el 75% o el 100% de los pares de grupo consecutivo (50) de pulsos de ondas acústicas (51) de duración t_1 y periodo (60) que separa dos grupos sucesivos (50) de pulsos de ondas acústicas (51)

de duración t_2 tienen un factor de modo de pulso $P_{mf} = \frac{t_1}{t_1 + t_2}$ que es mayor de o igual a 0,01, preferiblemente 0,025, más preferiblemente 0,1.

11.- Un método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, comprendiendo el campo acústico pulsado modulado una repetición de una pluralidad de grupos (50) de pulsos de ondas acústicas (51), teniendo dichos pulsos (51), entre un grupo (50) dado, sustancialmente la misma amplitud y frecuencia, y en el que al menos un par de grupo consecutivo (50) de pulsos de ondas acústicas (51) de duración t_1 y periodo (60) que separa dos grupos

$$P_{mf} = \frac{t_1}{t_1 + t_2}$$

sucesivos (50) de pulsos de ondas acústicas (51) de duración t_2 tienen un factor de modo de pulso que es menor de o igual a 0,95, preferiblemente 0,75, más preferiblemente 0,5, en el que al menos el 25%, mejor al menos el 50%, el 75% o el 100% de los pares de grupo consecutivo (50) de pulsos de ondas acústicas (51) de duración t_1 y periodo (60) que separa dos grupos sucesivos (50) de pulsos de ondas acústicas (51) de duración t_2

tienen preferiblemente un factor de modo de pulso $P_{mf} = \frac{t_1}{t_1 + t_2}$ que es menor de o igual a 0,95, preferiblemente 0,75, más preferiblemente 0,5.

12.- Un método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, teniendo al menos dos pares de grupo consecutivo (50) de pulsos de ondas acústicas (51) de duración t_1 y periodo (60) que separa dos grupos sucesivos

$$P_{mf} = \frac{t_1}{t_1 + t_2}$$

(50) de pulsos de ondas acústicas (51) de duración t_2 un factor de modo de pulso diferente.

13.- Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, teniendo todos los pares de grupo consecutivo (50) de pulsos de ondas acústicas (51) de duración t_1 y periodo (60) que separa dos grupos sucesivos (50) de pulsos

$$P_{mf} = \frac{t_1}{t_1 + t_2}$$

de ondas acústicas (51) de duración t_2 sustancialmente el mismo factor de modo de pulso

14.- Un método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, comprendiendo el campo acústico pulsado modulado una repetición de una pluralidad de grupos (50) de pulsos de ondas acústicas (51), teniendo dichos pulsos (51), entre un grupo (50) dado, sustancialmente la misma amplitud y frecuencia, y estando espaciados dichos grupos (50) de pulsos de ondas acústicas (51) periódicamente entre sí por un periodo (60) que tiene una duración distinta de cero.

15.- Un método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el agregado creado (20) es un agregado bidimensional, en el que la superficie superior y/o inferior (S_u ; S_i) del agregado creado (20) tienen preferiblemente una velocidad promedio temporal de crecimiento durante la etapa b) que es menor de o igual a 0,1 mm²/s, preferiblemente 0,05 mm²/s, más preferiblemente 0,03 mm²/s, más preferiblemente 0,015 mm²/s, en el que el agregado formado (20) de objetos (O) tiene preferiblemente un tamaño de 1 nm o más, siendo preferiblemente los objetos (O) células biológicas mono o polidispersas, preferiblemente líneas celulares tumorales o no tumorales de mamífero, células madre o líneas celulares primarias, siendo el tamaño promedio de los objetos (O) preferiblemente menor de o igual a 100 μm, mejor 50 μm, más preferiblemente 25 μm.

16.- Un método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el microcanal (2) comprende al menos una primera (3) y una segunda pared (4) que definen un volumen interno, en el que está presente dicho líquido (L) y en el que el agregado creado (20) no está en contacto con dichas paredes (3; 4) durante la etapa b).

- 5 17.- Un método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que, durante la etapa b) se mide al menos una característica del agregado (20) y se modifica al menos una característica del campo acústico pulsado modulado en función de esta medida, siendo la característica medida preferiblemente la velocidad temporal instantánea de crecimiento de la superficie superior y/o inferior (S_u ; S_i) del agregado creado (20).

10

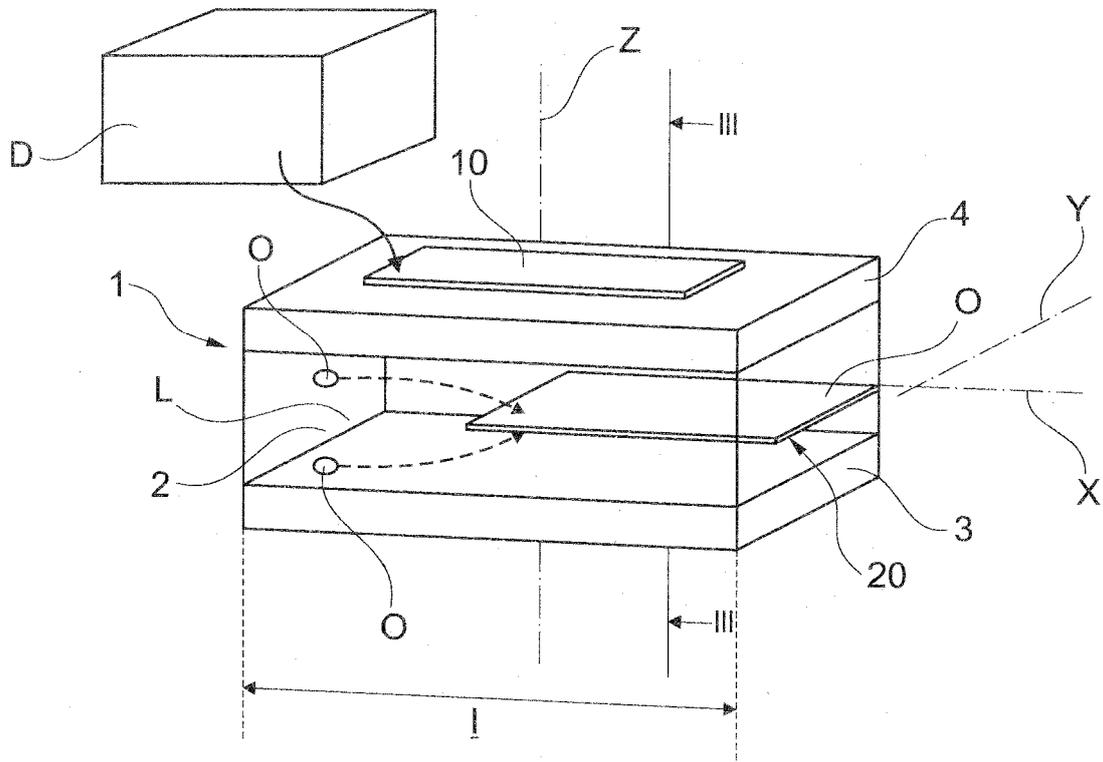


Fig. 1

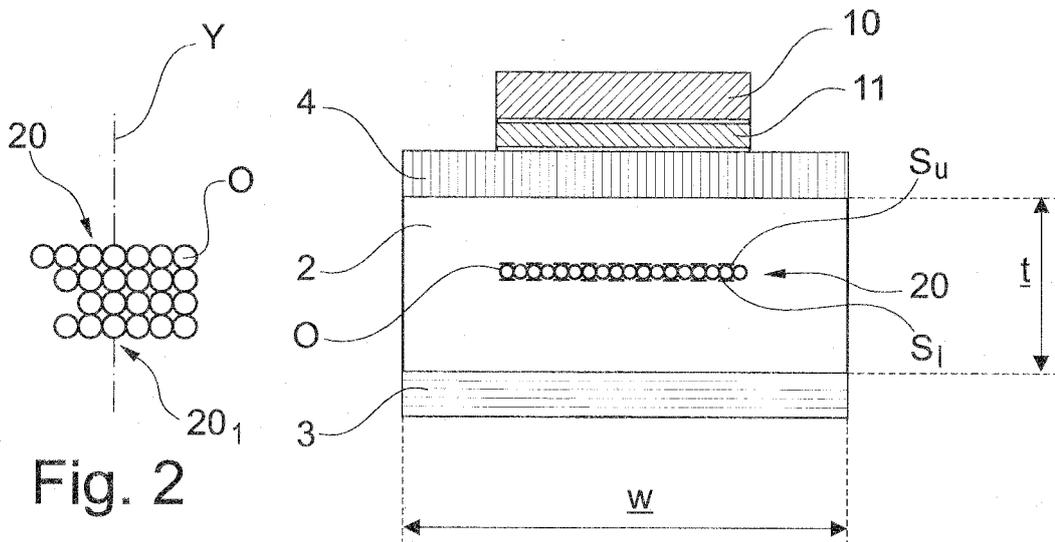


Fig. 2

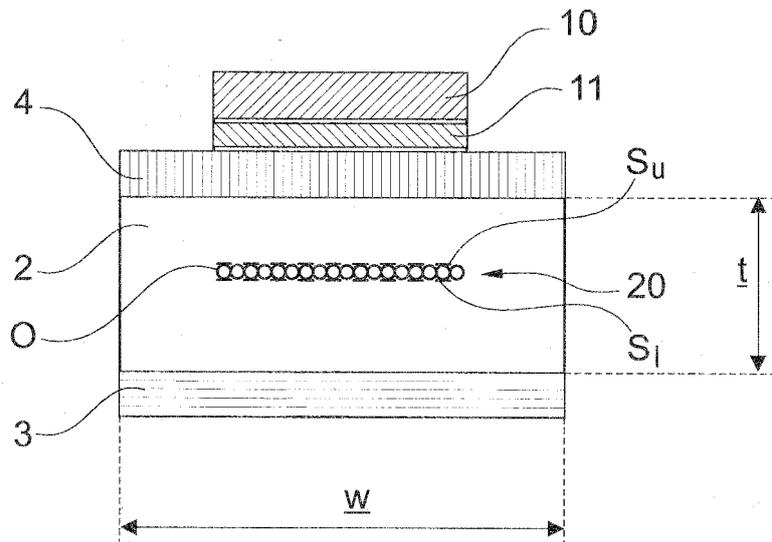


Fig. 3

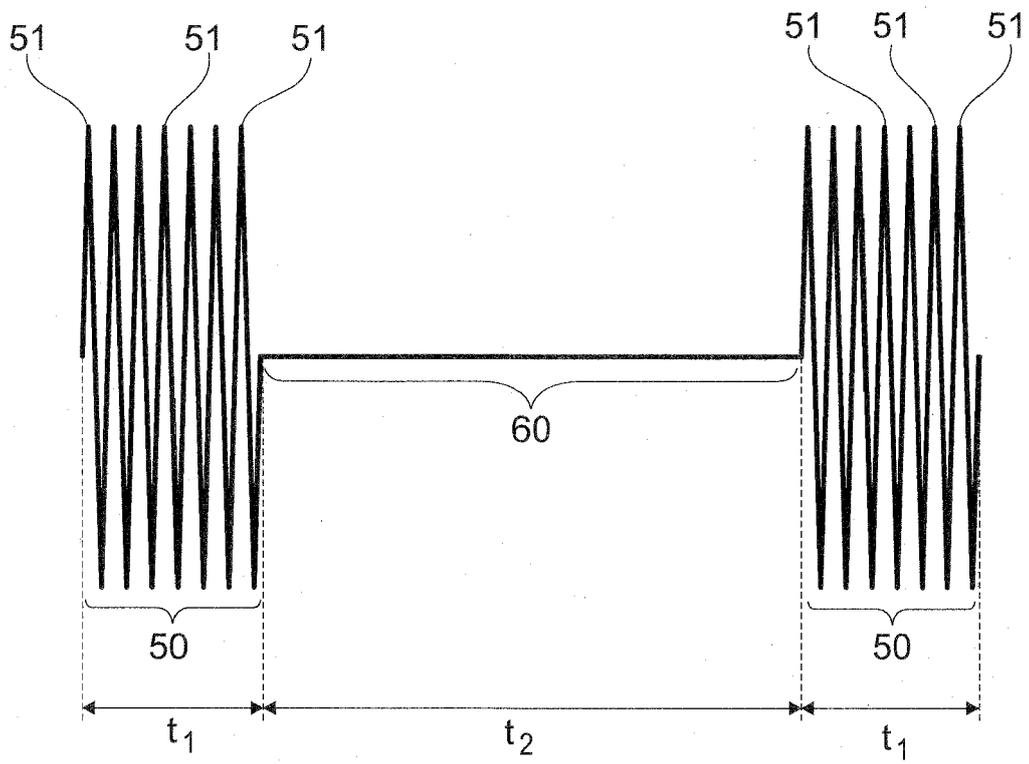


Fig. 4

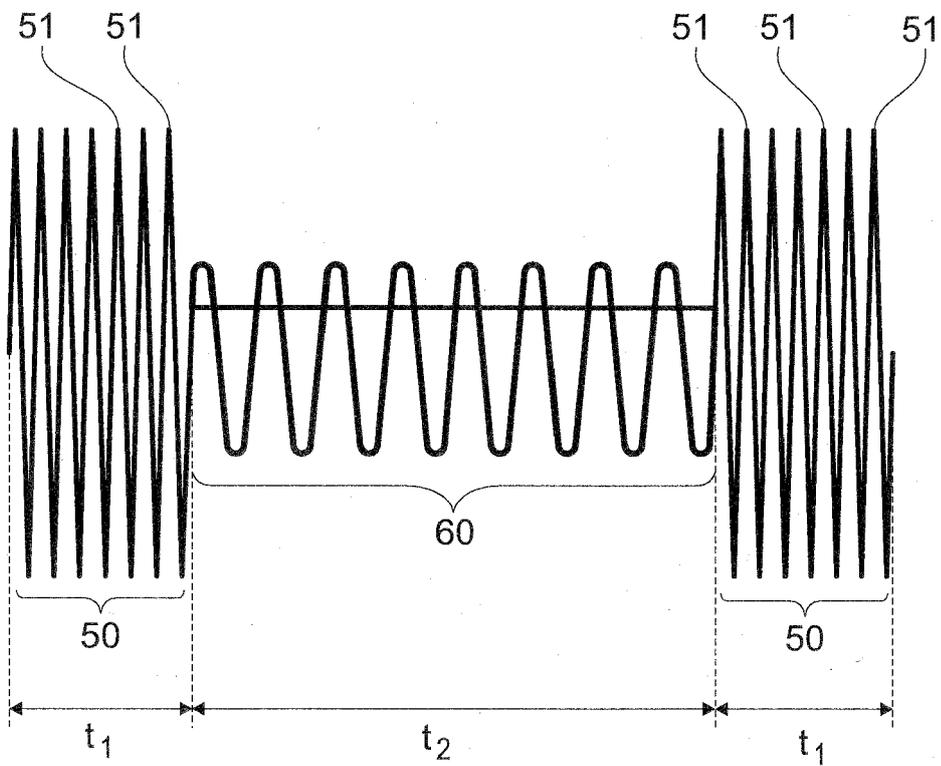


Fig. 5

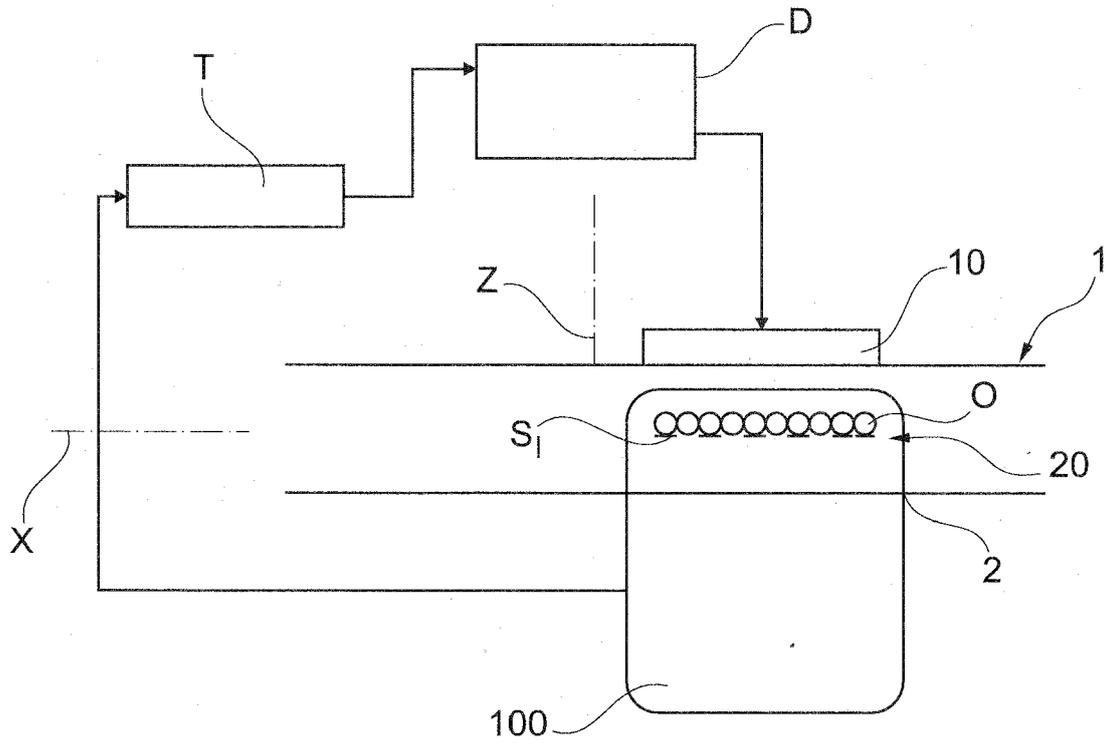


Fig. 6

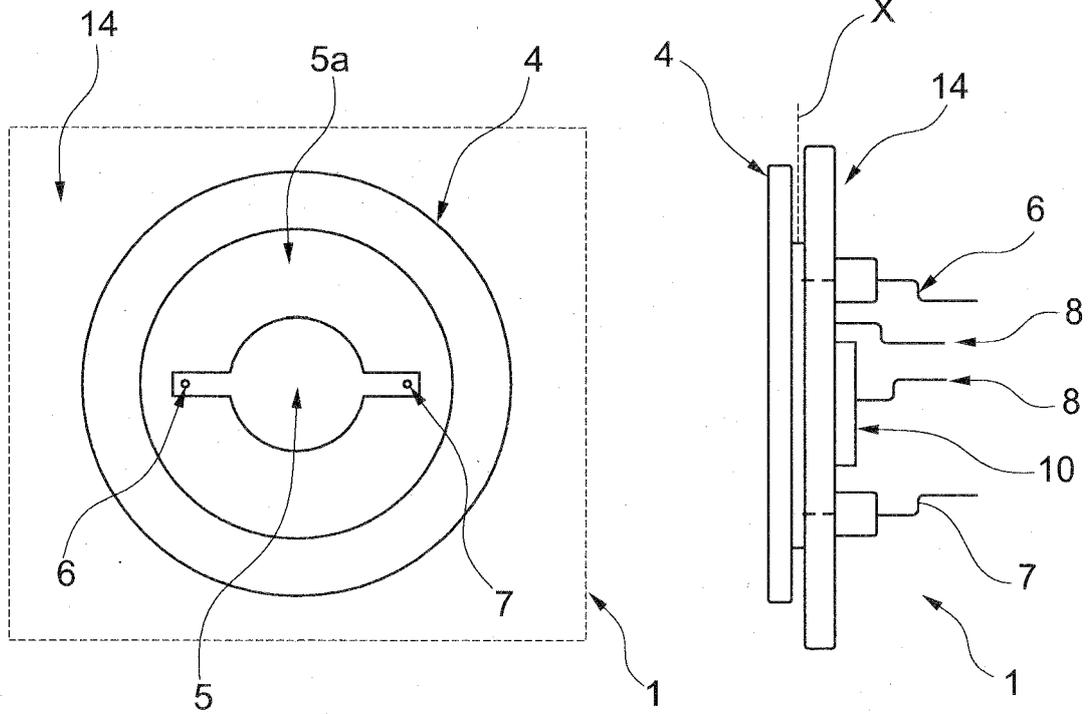


Fig. 7A

Fig. 7B

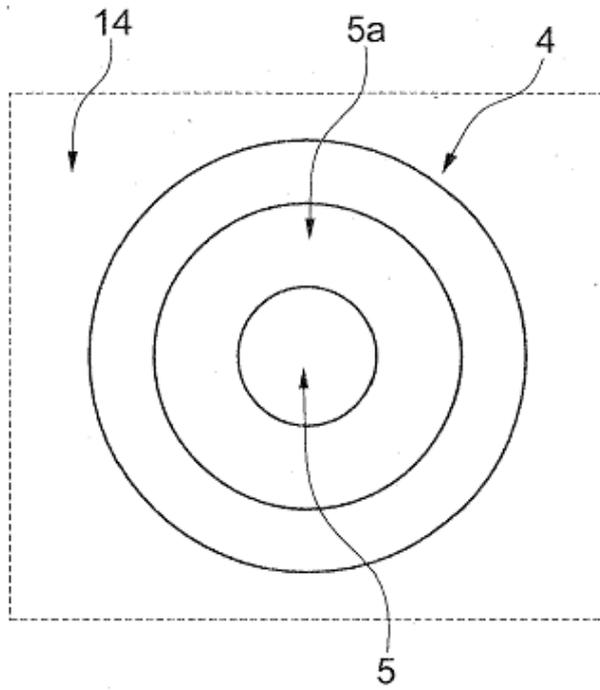


Fig. 7C

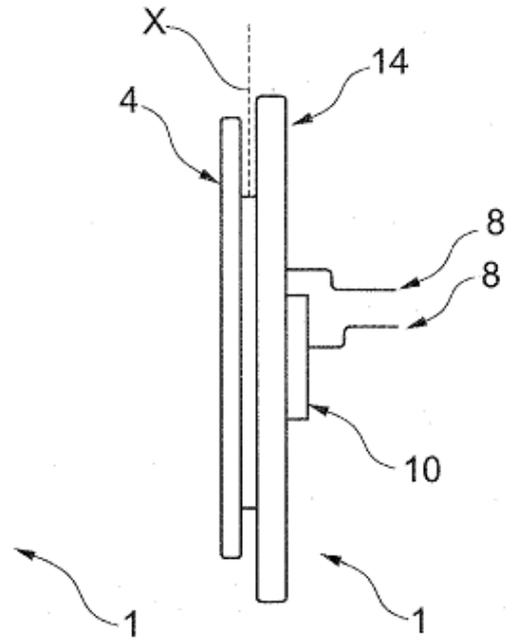


Fig. 7D

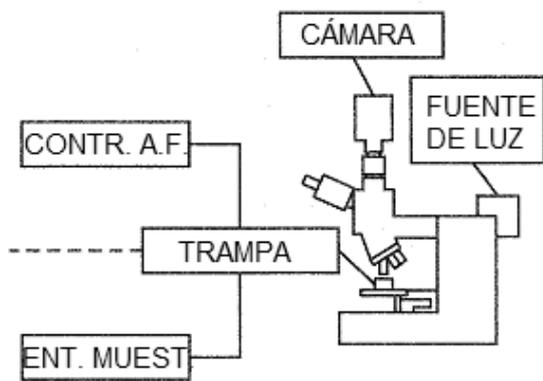


Fig. 8

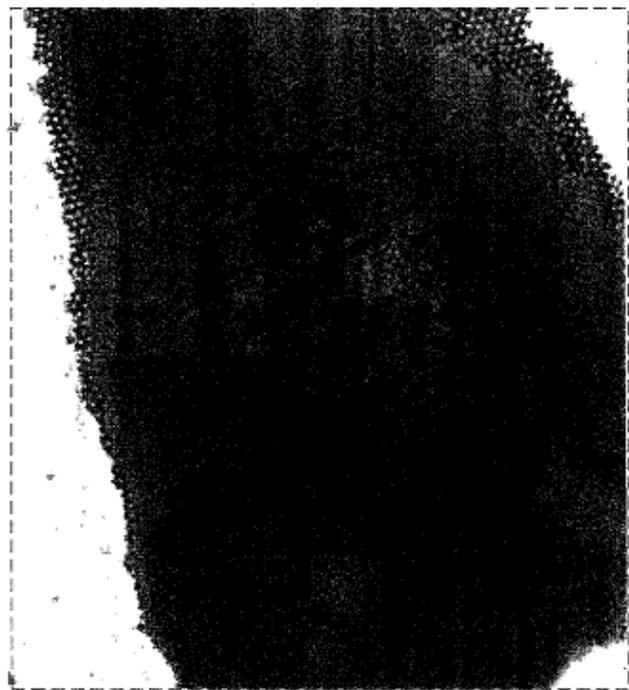


Fig. 9A

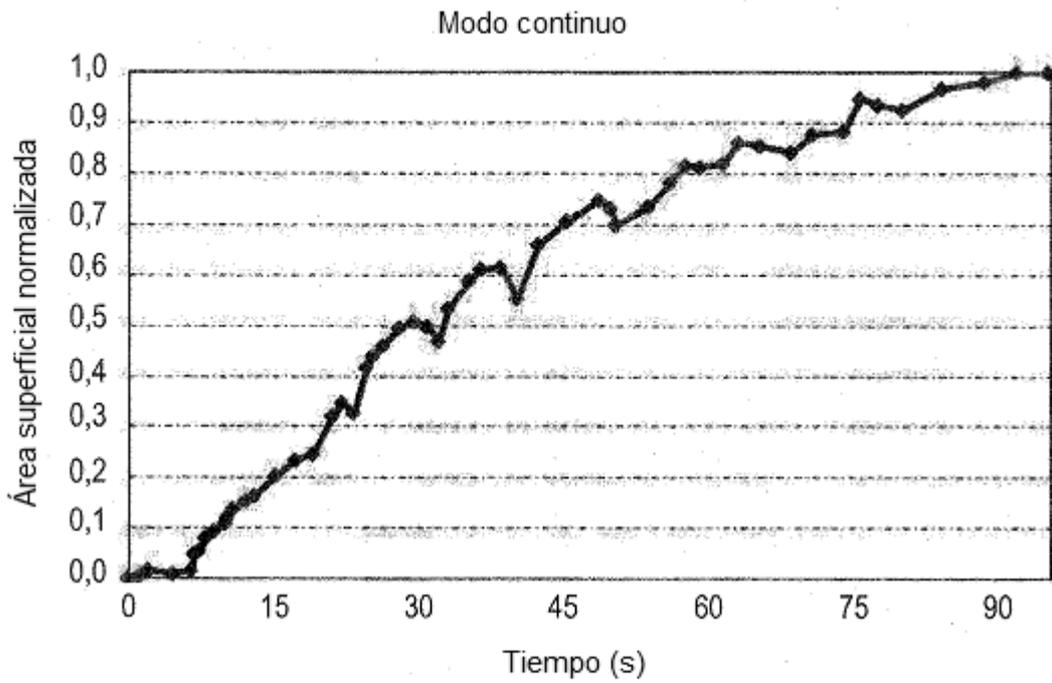


Fig. 9B

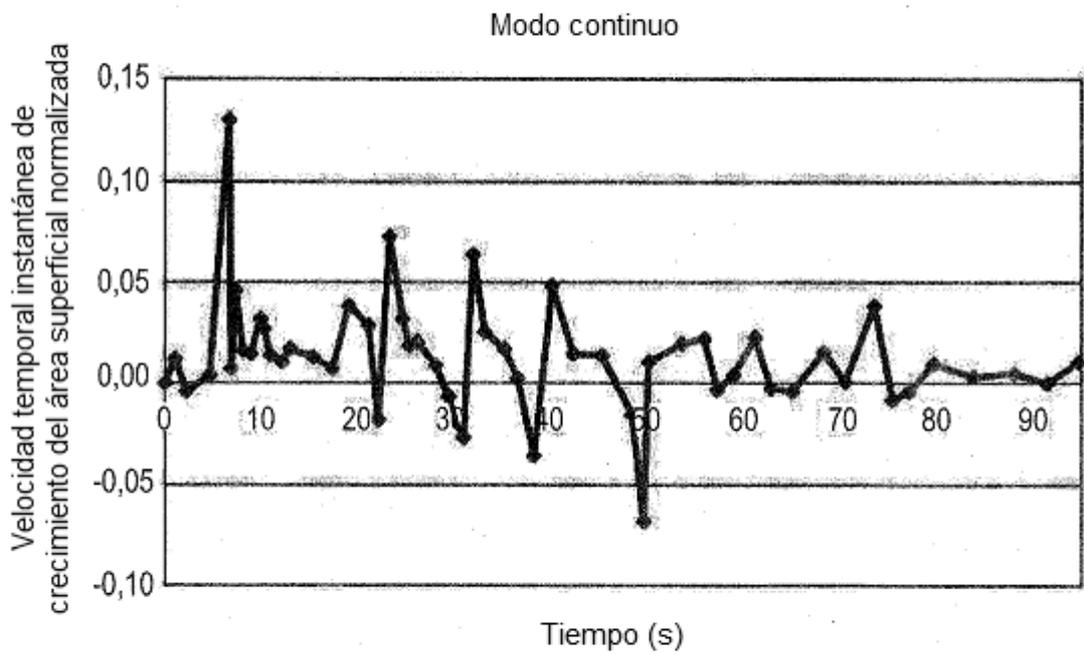


Fig. 9C

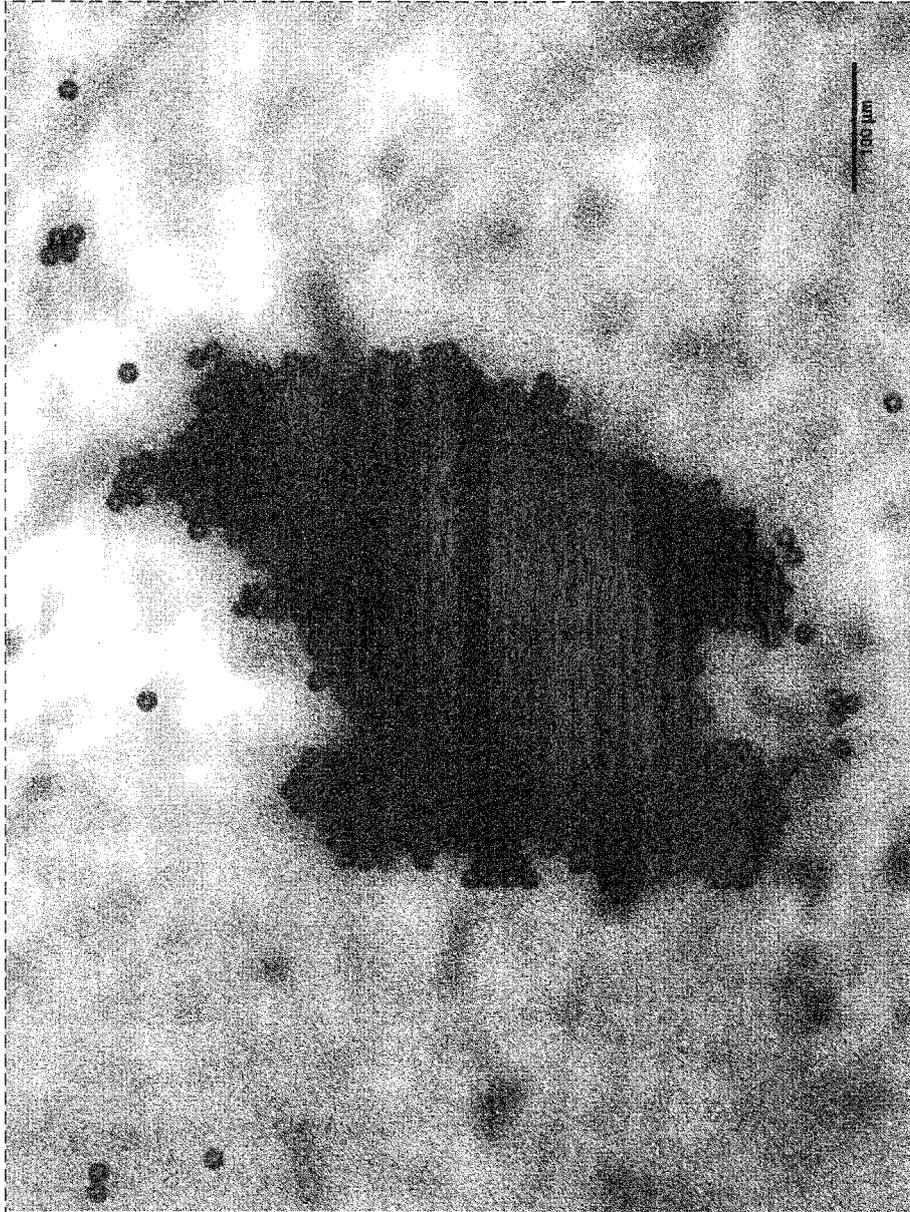


Fig. 10A

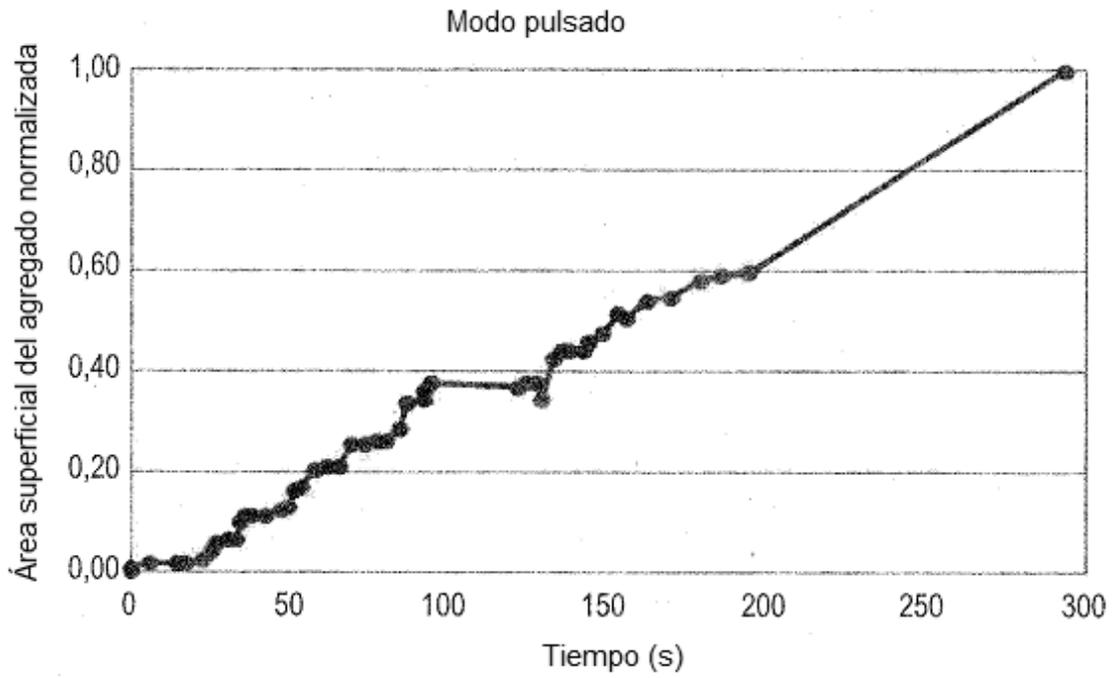


Fig. 10B

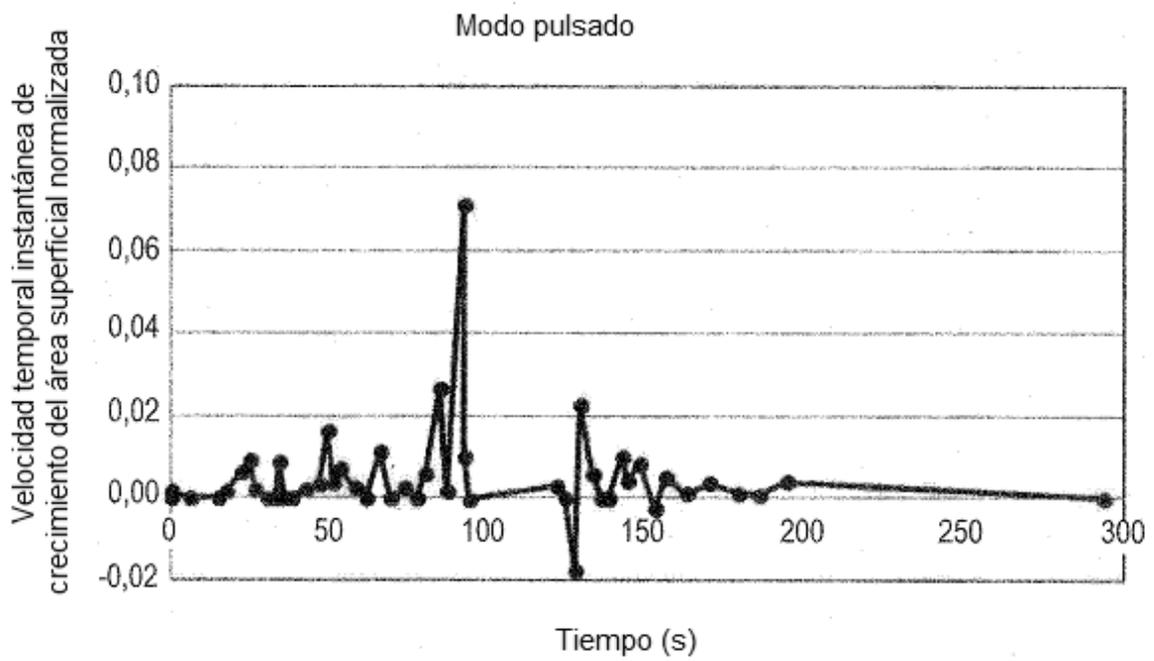


Fig. 10C

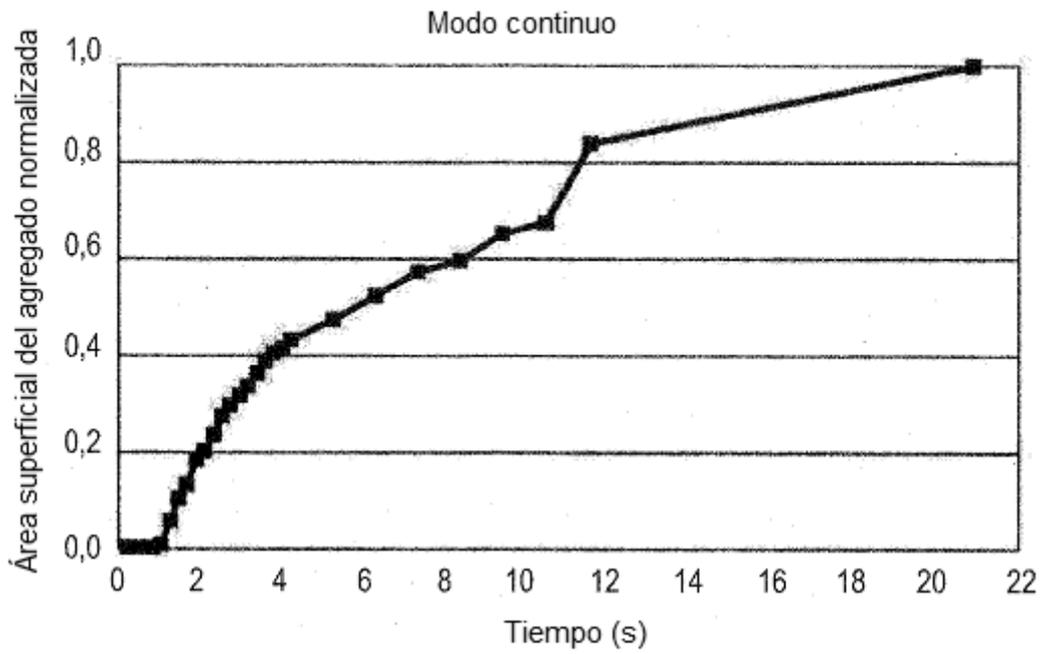


Fig. 11A

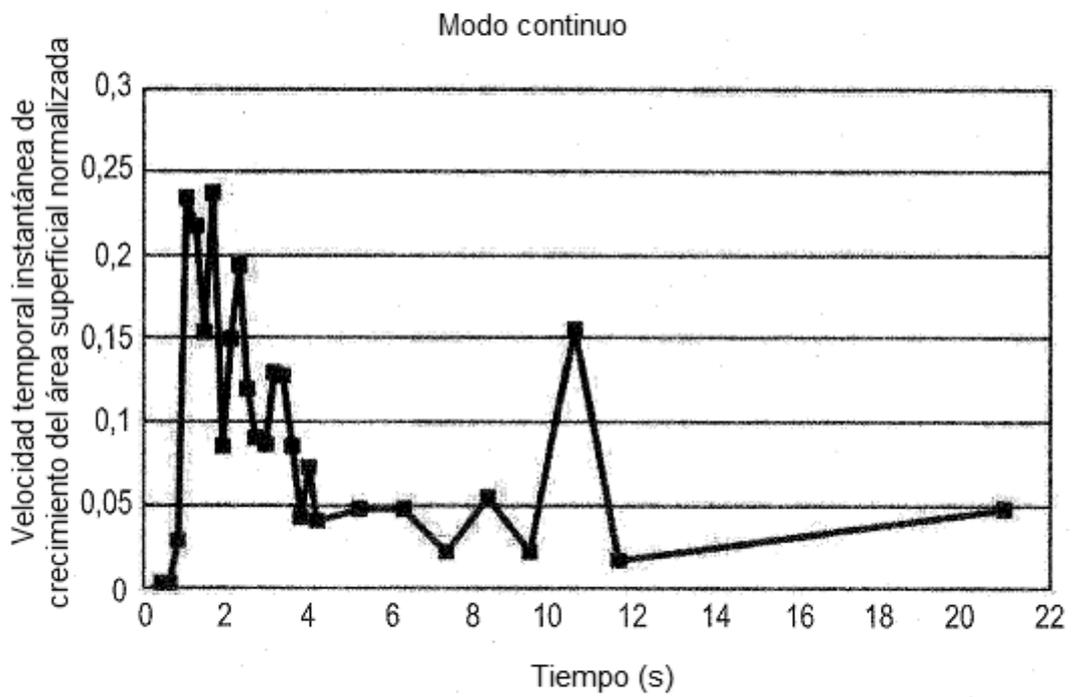


Fig. 11B

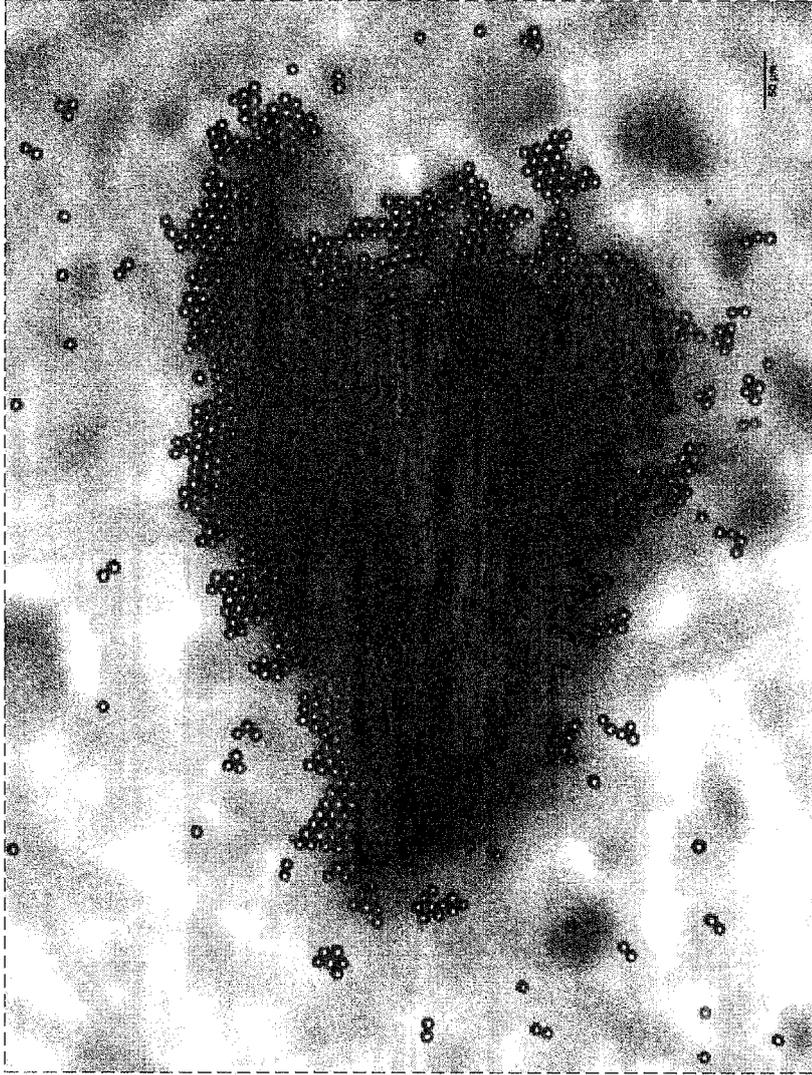


Fig. 12A

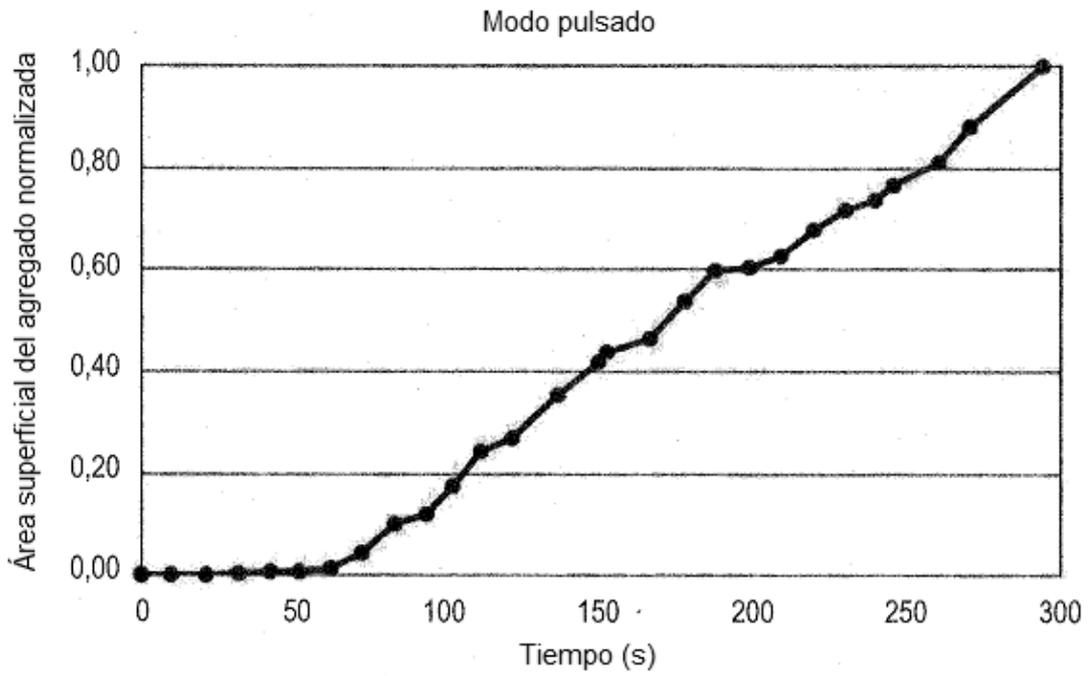


Fig. 12B

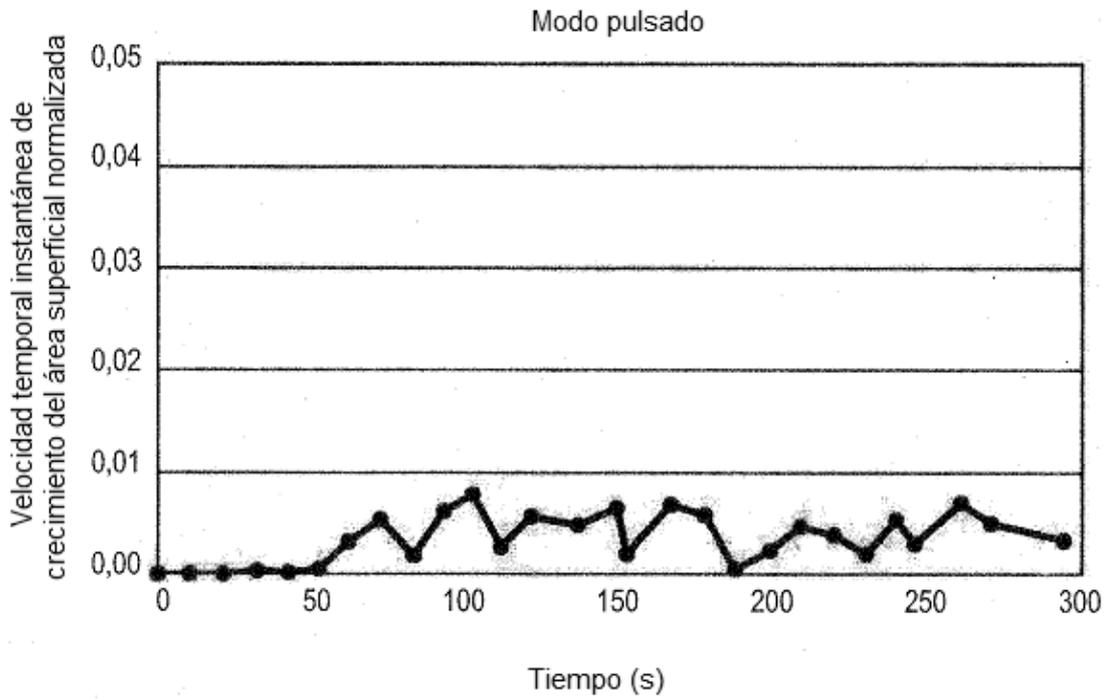


Fig. 12C

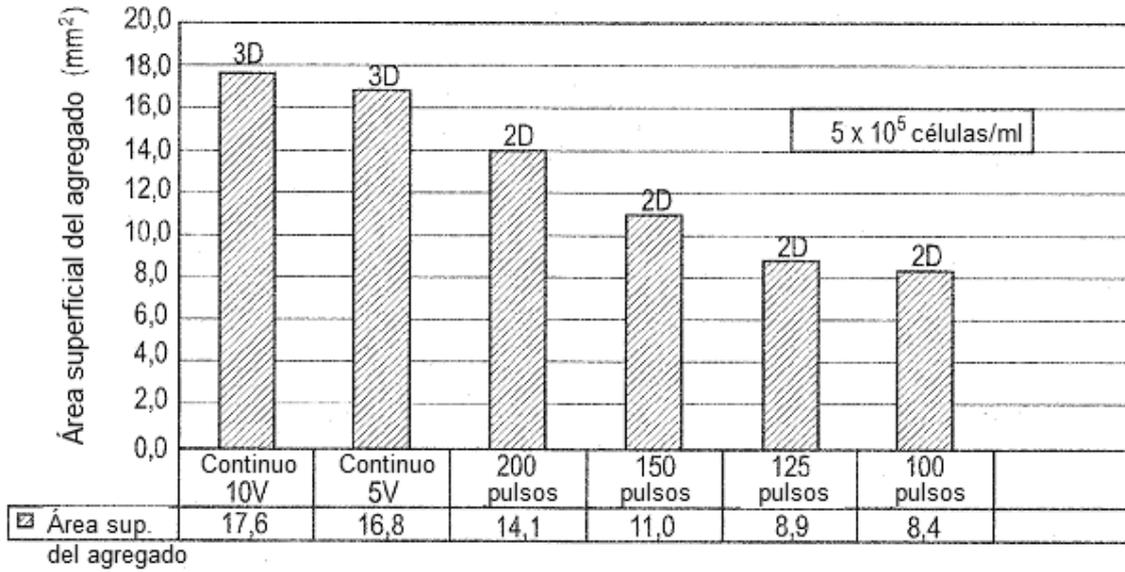


Fig. 13A

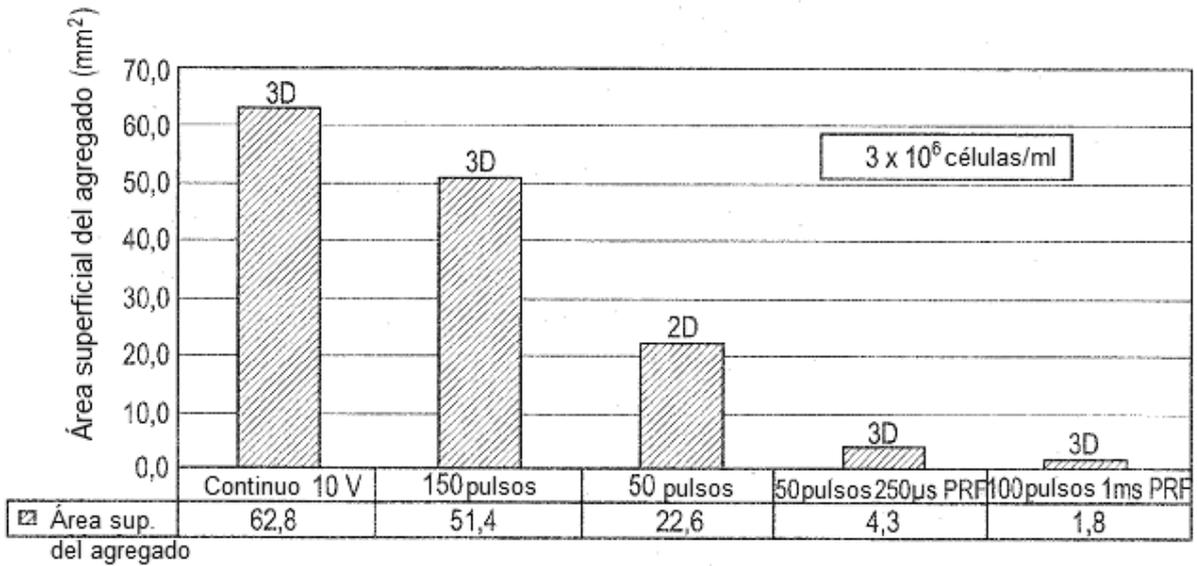


Fig. 13B

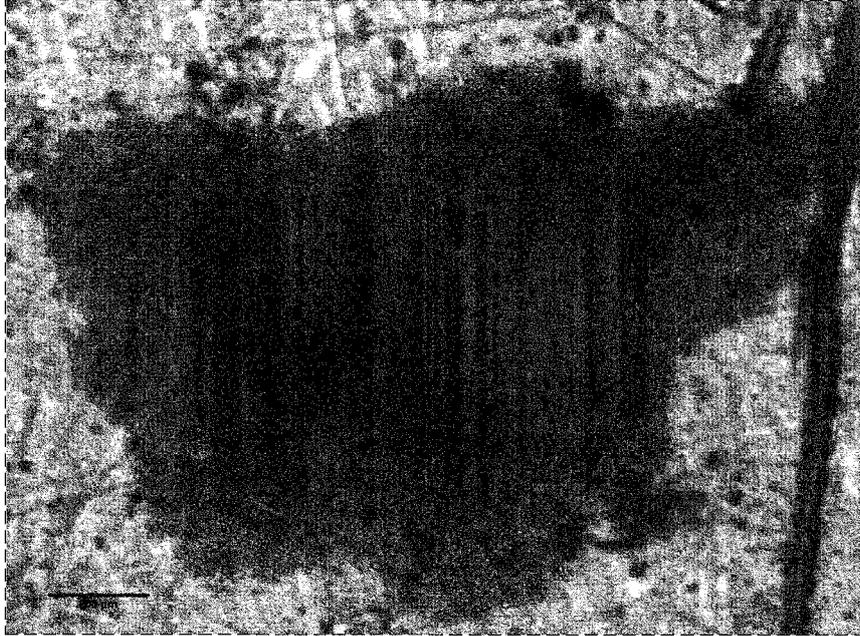


Fig. 14A

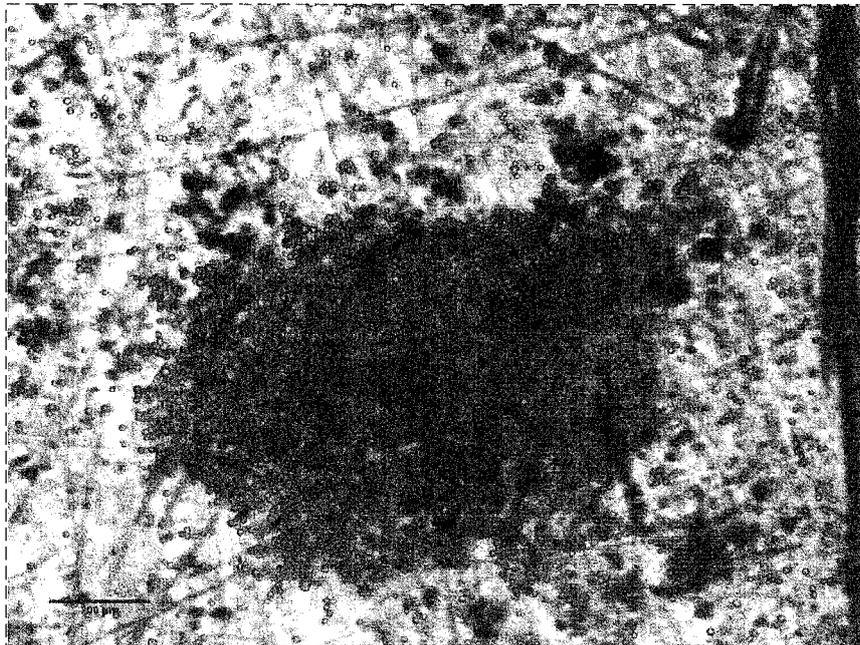


Fig. 14B

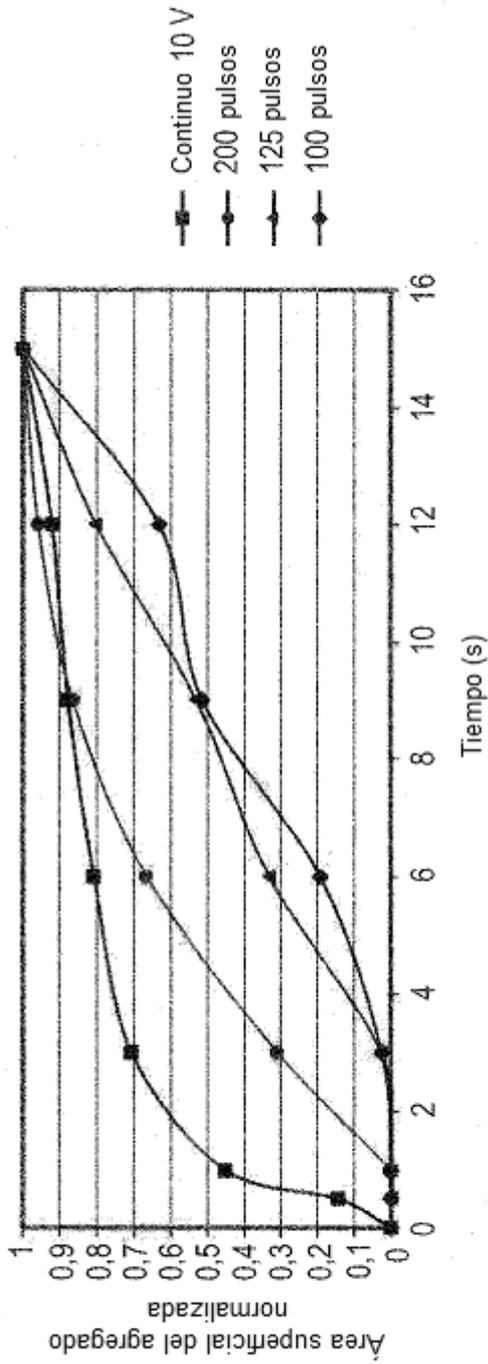


Fig. 15A

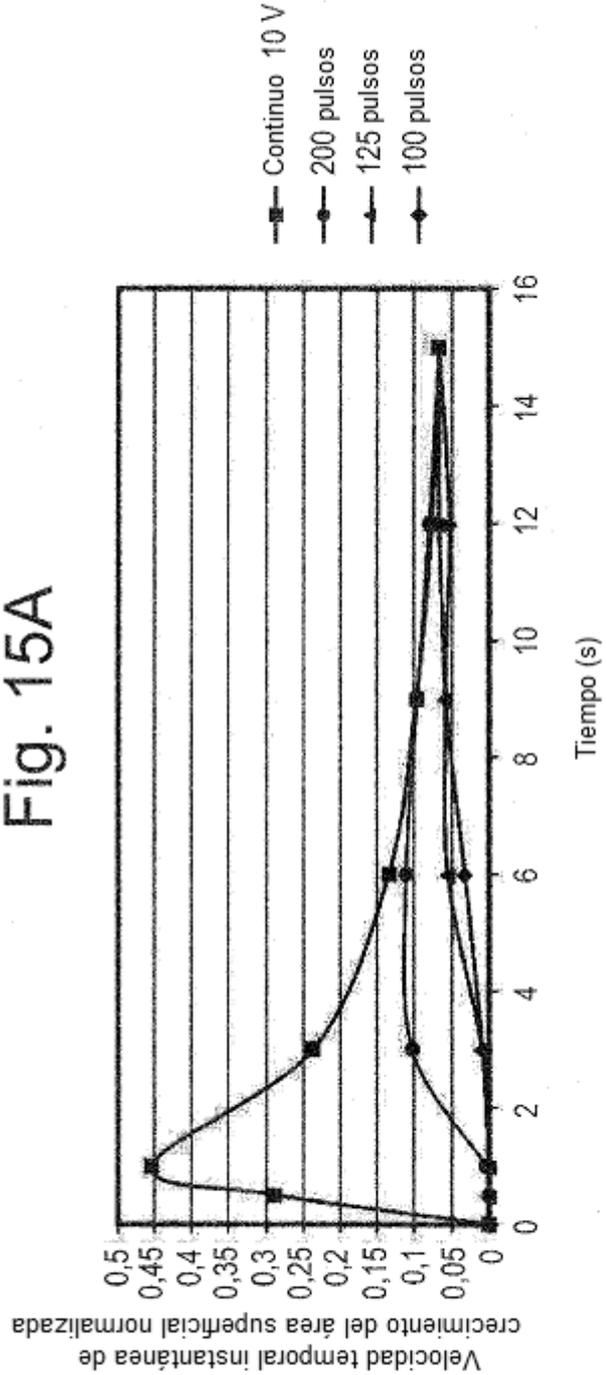


Fig. 15B

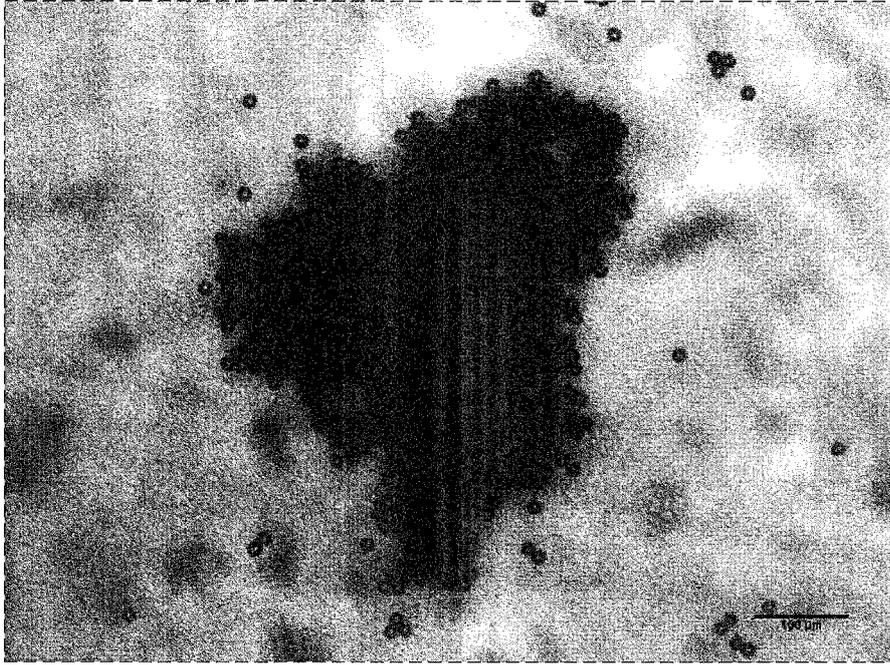


Fig. 16A

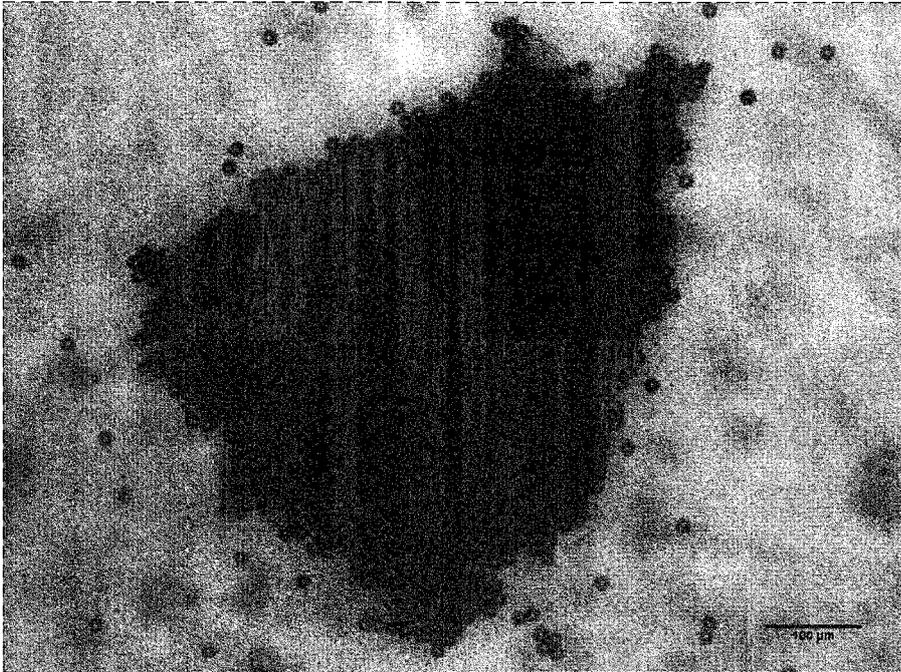


Fig. 16B